Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene,
Fleischhygiene und -technologie
Fachrichtung Lebensmittelhygiene des
Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

Beziehungen zwischen mikrobiologisch-kulturellem Befund und Pyruvatgehalt der Trinkmilch in Berlin (West) unter besonderer Berücksichtigung der Psychrotrophenflora

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rolf Röschke
Tierarzt aus Göggingen

Berlin 1977
Journal-Nr. 905

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene,
Fleischhygiene und -technologie
Fachrichtung Lebensmittelhygiene des
Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

Beziehungen zwischen mikrobiologisch-kulturellem Befund und Pyruvatgehalt der Trinkmilch in Berlin (West) unter besonderer Berücksichtigung der Psychrotrophenflora

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

R o l f R ö s c h k e
Tierarzt aus Göggingen

Berlin 1977
Journal-Nr. 905

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender des FBR:	Prof. Dr. H.H. Frey
Referent:	Prof. Dr. H.-J. Sinell
Korreferent:	Prof. Dr. E. Hellmann

Tag der Promotion: 14. April 1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549616_0068

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	3
2.1.	Die bakteriologisch-hygienische Wertigkeit der Milch	
2.2.	Stand der Qualitätsbestimmung in der Milch	6
2.2.1.	Konventionelle Methoden zur Bestimmung der Qualität der Milch	
2.2.2.	Modifikation konventioneller Methoden zur Erfassung der psychrotrophen Keimflora	9
2.2.3.	Pyruvatbestimmung zur Erfassung der Keimflora unter psychrotrophen Bedingungen	1o
2.2.3.1.	Stellung des Pyruvats im Intermediärstoffwechsel	11
2.2.3.2.	Ergebnisse der Pyruvatuntersuchung der Milch	13
2.2.3.2.1.	Untersuchungstechnische Vorteile der Pyruvatanalyse	
2.2.3.2.2.	Einfluß sekretorischer Faktoren auf den Pyruvatgehalt	14
2.2.3.2.3.	Pyruvat-Basiswert	15
2.2.3.2.4.	Entwicklung von Keim- und Pyruvatgehalt in Rohmilch	
2.2.3.2.5.	Beziehungen zwischen Reduktionsvermögen, Pyruvatgehalt und Gesamtkeimgehalt	16
2.2.3.2.6.	Zur Abhängigkeit der Pyruvatzunahme von der Keimvermehrung	18
2.2.3.2.7.	Einfluß der Keimart auf den Pyruvatgehalt	
2.2.3.2.8.	Pyruvat bei der Pasteurisierung	
2.2.3.2.9.	Entwicklung von Keim- und Pyruvatgehalt in pasteurisierter Trinkmilch	2o
2.2.3.2.1o.	Versuch der Festlegung von Pyruvatgrenzwerten zur Qualitätsüberwachung der Milch	21
2.2.3.2.11.	Der Pyruvatdifferenzwert	

Seite

2.2.3.2.12. Einschätzung der Vor- und Nachteile der Pyruvatbestimmung als Kriterium der hygienischen Beschaffenheit der Milch 22

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 23

3.1. Material

3.2. Methodik

3.2.1. Probenentnahme

3.2.2. Kulturelle Untersuchungen 24

3.2.3. Pyruvatbestimmung 26

3.2.3.1. Prinzip

3.2.3.2. Auswahl der Methode und der Reagenzien

3.2.3.3. Verfahren 27

3.2.3.3.1. Entfettung und Enteiweißung

3.2.3.3.2. Pufferung zur photometrischen Bestimmung 28

3.2.3.3.3. Bestimmungsansatz

3.2.3.3.4. Extrapolation der Meßwerte

3.2.3.4. Eichkurve 3o

3.2.3.5. Berechnung des methodischen Fehlers der Pyruvatbestimmung und Prüfung der homogenen Verteilung des Pyruvats in der Milch 32

3.2.3.6. Einfluß des Einfrierens auf den Pyruvatgehalt 33

3.3. Untersuchungsergebnisse 34

3.3.1. Kulturelle Untersuchungen der Trinkmilch in Berlin (West)

3.3.1.1. Gesamtkeimgehalt

3.3.1.2. Verhältnis der psychrotroph (4-5°C) zu den mesophil (3o°C) subkultivierten Keimen 35

3.3.1.3. Thermophile Keime (bei 43°C bebrütet) 37

3.3.1.4. Oxydasepositive Keime 39

3.3.1.5. Enterokokken 4o

3.3.1.6. Coliforme Keime, Enterobacteriaceae 41

Seite

3.3.1.7. Mikrokokken, eigelbpositive Staphylokokken 43

3.3.1.8. Pasteurisierung 44

3.3.2. Pyruvat in der Milch 46

3.3.2.1. Pyruvatgehalt, mesophiler und psychrotropher Keimgehalt in Rohmilch

3.3.2.2. Verlaufsuntersuchungen bei 4-5°C über mehrere Tage 5o

3.3.2.3. Abhängigkeit des Pyruvatgehalts einer Milch vom Verhältnis der psychrotrophen zu den mesophilen Keimen 57

3.3.2.4. Einfluß der Temperatur auf die Entwicklung von Gesamtkeim- und Pyruvatgehalt im Standversuch 59

3.3.2.5. Pyruvat bei der Pasteurisierung der Milch 61

3.3.2.6. Beziehung zwischen Pyruvat- und Gesamtkeimgehalt in pasteurisierter Milch 62

4. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN 63

4.1. Ergebnis der kulturellen Analyse der Milch

4.2. Pyruvatanalytik 65

4.3. Schlußfolgerungen 7o

5. ZUSAMMENFASSUNG 72

SUMMARY 74

6. LITERATUR 76

1. EINLEITUNG

Die in der Milch enthaltenen saprophytären Keime vermindern deren Qualität. Sie führen durch Abbau von Eiweiß, Fett und Kohlenhydraten und Freisetzung entsprechender Stoffwechselprodukte schließlich zur Fäulnis, Ranzigkeit oder Säuerung der Milch. Als wesentlichstes Qualitätskriterium für die hygienische Beschaffenheit der Milch wird deshalb bis heute ihre Gesamtkeimzahl angesehen. Die Milchüberwachung gründet sich daher auf die Bestimmung der Keimzahl selbst, aber auch auf Schnellmethoden zur Bestimmung von mikrobiellen Stoffwechselprodukten, die Rückschlüsse auf die Keimzahl zulassen. Die konventionellen Schnellmethoden gingen dabei von der Voraussetzung aus, daß die Zeitspanne zwischen Milchproduktion und -konsum nur kurz und deshalb auch nur eine mäßige Kühlhaltung erforderlich ist. Ihre Grundlage ist die Erfassung der Stoffwechselprodukte solcher Keimarten, die vor allem bei wärmeren Temperaturen dominieren. Die Milchsäure z.B. ist hierfür ein typisches Produkt, das bei der Vermehrung glykolytischer Keime entsteht.

Seit einigen Jahren macht die Milchwirtschaft jedoch einen zunehmenden Wandel durch, der aus der Konzentration der Milchproduktion und -verarbeitung resultiert. Die Milch wird aus Rentabilitätsgründen nicht mehr zweimal täglich, sondern nur noch einmal oder sogar nur jeden zweiten Tag von den Molkereien zur Weiterverarbeitung gesammelt. Gleichzeitig haben sich die Entfernungen der Milchproduzenten zu weniger und leistungsfähigeren Molkereien, sowie die Entfernungen zum Konsumenten vergrößert. Damit wächst die Zeitspanne zwischen Produktion und Konsum der Milch, und eine kontinuierliche intensive Kühlung der Milch wird erforderlich, um Qualitätsverluste zu vermeiden. Mit der Kühlung der Milch ändert sich jedoch ihre Keimflora, es treten vor allem proteolytische, also eiweißabbauende Keimarten in den Vordergrund. Diese können mit den herkömmlichen Schnellmethoden nicht mehr hinreichend erfaßt werden.

Neue Methoden zur Qualitätsbeurteilung mußten entwickelt werden. Die aussichtsreichste Perspektive in dieser Hinsicht bietet die Messung des Pyruvatgehalts der Milch. Pyruvat stellt

nach den bisherigen Erfahrungen einen geeigneten Stoffwechselparameter dar, der neben glykolytischen auch proteolytische und lipolytische Abbauvorgänge zu erfassen erlaubt, die besonders bei Kühllagerung der Milch dominieren.

Die auf diesem Gebiet gemachten Erfahrungen mit eigenen Versuchen zu überprüfen, sowie neue Erkenntnisse über den Grad der Genauigkeit zu gewinnen, mit der vom Pyruvatgehalt auf den Keimgehalt der Milch bzw. auf die Milchqualität selbst geschlossen werden kann, ist die Aufgabe der vorliegenden Arbeit. Dazu wurde der bakteriologische Status der Trinkmilch aus Berlin-West und der Pyruvatgehalt vor und nach der Pasteurisierung bestimmt und ihre gegenseitige Abhängigkeit analysiert.

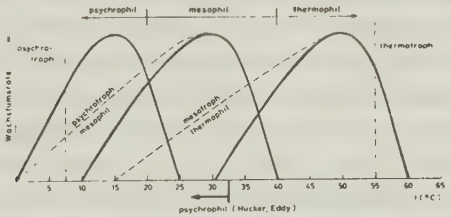
2. SCHRIFTTUM

2.1. Die bakteriologisch-hygienische Wertigkeit der Milch

In vielerlei Hinsicht kann die Qualität der Milch beeinträchtigt werden: durch überhöhten Zellgehalt als Ausdruck einer Funktionsstörung der Milchdrüse, durch pathogene und saprophytäre Mikroorganismen sowie deren Stoffwechselprodukte und durch chemische Rückstände wie Pestizide, Antibiotika und chlorierte Kohlenwasserstoffe. Im Rahmen dieser Arbeit interessierten nur die saprophytären Mikroorganismen, die für den Verderb der Milch verantwortlich sind.

Im gesunden Euter ist die Milch noch steril (HEIDRICH et al., 1964), aber bereits beim Melken, beim Passieren des Ductus papillaris wird sie kontaminiert, besonders bei unsachgemäßem Melken (OLSON, 1962). Weitere Kontamination erfolgt durch Luftkeime sowie durch ungenügend desinfizierte Melkanlagen und Behältnisse (MACKENZIE, 1973). Da die Milch ein geeignetes Nährmedium für die Keime darstellt, erhöht sich der Keimgehalt ständig in Abhängigkeit von der eingetretenen Kontamination, der Zeit, der Temperatur und den vorhandenen Keimarten.

Nach der Abhängigkeit der optimalen Wachstumsgeschwindigkeit der Keime von der Temperatur werden psychro-, meso- und thermophile Keime unterschieden. Die Abbildung 1 nach KANDLER (1966) veranschaulicht diesen Zusammenhang.



Schematische Darstellung der verschiedenen Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der Temperatur und deren Bezeichnungsweise.

Abbildung 1 nach KANDLER (1966)

Keime, deren Wachstumsoptimum unter 20°C liegt, werden als psychrophil bezeichnet, über 40°C als thermophil, zwischen 20° und 40°C als mesophil. Nach einem Beschluß des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes im Jahre 1968 in Brighton/England werden solche Keime als psychrotroph definiert, die sich noch bei Temperaturen unter +7°C vermehren können (BECK, 1972). Der Temperaturbereich, in dem ihr Wachstumsoptimum liegt, spielt hier also keine Rolle. Es gibt sowohl psychrotroph psychrophile als auch psychrotroph mesophile Keime.

In ungekühlter oder unzureichend gekühlter Milch vermehren sich vor allem lactoseabbauende grampositive Stäbchen sowie Streptokokken (bes. Sc. lactis), Lactobazillen, Mikrokokken und gramnegative coliforme Bakterien. Als Produkt dieser Glykolyse entsteht Milchsäure, sie kann bis zum Verderben der Milch durch Sauerwerden führen.

Mit der Konzentration von Milchproduktion und -verarbeitung nehmen die zeitlichen und räumlichen Abstände zwischen Produktion, weiterer Behandlung und Konsum zu. Deshalb wird eine kontinuierliche, intensive Kühlung der Milch vom Melken an erforderlich, um die Haltbarkeit über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten. Wird die Milch jedoch ausreichend gekühlt, dann setzt sich eine kälteliebende eiweiß- und fettabbauende gramnegative Keimflora durch, da zum einen niedrige Temperaturen einen Selektionsdruck zugunsten der Psychrotrophen und zuungunsten der Mesophilen ausüben (INGRAM, 1951) und zum anderen die bei höheren Temperaturen erfolgende Wachstumshemmung der gramnegativen Keimflora infolge Milchsäurebildung entfällt (TOLLE, 1969). Verschiedene Autoren berichten übereinstimmend, daß in gekühlter Rohmilch bereits nach drei Tagen die psychrotrophe Keimflora dominiert. Nach BOCKELMANN (197o) nimmt der Anteil der psychrotrophen Keime von 18 % des Gesamtkeimgehalts am ersten Tag auf 65 % am dritten Tag zu. Nach GRÜN und KONSTANTINIDOU (1971) weist eine bis drei Tage alte Rohmilch bei 4°C gelagert einen Anteil psychrotropher Keime von 67.3 % auf. Nach PORUBIAKOVÁ und PREKOPP (1971) geht bei 5-7°C - Lagerung von Schafmilch eine Verneunfachung der Gesamtkeimzahl innerhalb von drei Tagen mit einer Zunahme der psychrotrophen Keimzahl um das 345-fache einher. Aus diesen

Grund wird in der überproportionalen Zunahme der psychrotrophen Keime und der damit verbundenen Eiweißschädigung eine Qualitätsminderung der Milch gesehen (GROSSERHODE, 1974). Die psychrotrophen Keime werden als die eigentlichen Verderbniserreger angesehen (CREDIT et al., 1972; LITT, 1974).
Die ersten Anzeichen des psychrotrophen Milchverderbs zeigen sich in Flavordefekten, die bereits nach 48stündiger 0°- 4°C-Lagerung bei der Hälfte der daraufhin untersuchten Milchproben auftraten und zwar bei Keimzahlen unter 10^{8}/ml (ELLIOT et al., 1974). Sie sind vor allem eine Folge der Proteolyten, die eine Hydrolyse des Caseins bewirken, aber auch eine Folge der Lipolyten und ihrer Fetthydrolyse, wodurch ungesättigte Fettsäuren freiwerden. Sterile mit Reinkulturen verschiedener Pseudomonas- und Aerobacterstämme beimpfte Milchen zeigen sowohl bei 8°C(7 Tage)- als auch bei 4°C(12 Tage)-Lagerung jeweils bei Keimzahlen um 6 x 10^{7}/ml die ersten Geschmacksfehler (KIURU et al., 1971). Lipolyse und Proteolyse führen schließlich zur Ranzigkeit und Fäulnis der Milch.

Bei den psychrotrophen Keimen handelt es sich neben Hefen und Pilzen vor allem um Bakterien. Sie gelangen unvermeidlich in die Milch, da sie ubiquitär, besonders im Wasser und in der Umgebung der Kühe vorkommen (LOTT, 197o und 1972), sowie in den Futtermitteln (DRUCE und THOMAS, 197o). Nach einer Untersuchung von NAKAE (197o) waren 9o.4 % von 456 aus Milch gezüchteten Psychrotrophen gramnegative Stäbchen. Davon waren 52 % Pseudomonas-Arten, 27.6 % "Achromobacter" (nach BERGEY's Manual seit 1974 nicht mehr existent), 4.6 % Alcaligenes, 4.o % Coli-aerogenes-Keime (Enterobacteriaceae) und 2.2 % Flavobakterien. Nur 9.6 % der Psychrotrophen waren grampositiv wie Streptokokken, Mikrokokken und Bazillusarten. Für Milch besonders schädliche Pseudomonas-Arten sind Pseudomonas fragi, putrefaciens, aeruginosa und fluorescens (GYLLENBERG und EKLUND, 1966), sie sind die aktivsten proteolytischen und lipolytischen Milchverderber. Die Bedeutung der psychrotrophen Keime in gekühlter Milch liegt in ihrer Fähigkeit, viele organische Verbindungen als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (BRAATZ, 1975). Eine Untersuchung von 3oo aus Hofbehältermilch isolierten psychrotrophen Stämmen ergab, daß

53 % proteolytisch sind, 84 % davon waren Pseudomonaden (KIURU et al., 1971). Der nächst größere Anteil der psychrotrophen Keime ist lipolytisch. Insgesamt können in roher tiefgekühlter Milch mehr als 5o % aller vorhandenen Bakterien eiweiß- und fettabbauend sein (ELLIOT et al., 1974).

2.2. Stand der Qualitätsbestimmung in der Milch

2.2.1. Konventionelle Methoden zur Bestimmung der Qualität der Milch

Der genaueste und zuverlässigste Parameter für die Qualität der Milch ist nach LANG (1967) immer noch die Bestimmung der Gesamtkeimzahl. Bei der direkten Keimzahlbestimmung nach Breed werden die Keime direkt mikroskopisch ausgezählt. Bei der indirekten Keimzahlbestimmung, dem Koch'schen Plattenverfahren, wachsen die vermehrungsfähigen Keime durch Bebrüten auf Agar-Nährböden zu Kolonien aus, die dann ausgezählt werden (KOTTERER-MÜNCH, 1972). Durch selektive Nährmedien und bestimmte Bebrütungstemperaturen können darüber hinaus bestimmte Keimarten gesondert erfaßt werden. Diese Methoden sind zwar sehr genau, aber recht zeit- und arbeitsaufwendig. Eine wesentliche Vereinfachung stellen die Mikrokoloniezählung mit elektronischem Zählgerät dar und die sog. Computer-Bild-Analyse von Plattenkulturen (TOLLE et al., 1966; TOLLE et al., 1968; WERNERY, 1972). Das Ergebnis stellt allerdings - wie auch bei der einfachen Koloniezählung - nicht die exakte Keimzahl dar, denn zum einen können es mehrere zusammengelagerte Keime sein, die dann nur zu einer einzelnen Kolonie auswachsen, zum anderen enthält die Milch auch Keime, die sich unter den üblichen Kulturbedingungen nicht entwickeln. Im anglo-amerikanischen Schrifttum hat sich deshalb folgerichtig der Begriff der "colony forming unit" (cfu), der koloniebildenden Einheit geprägt. Die Mikrokolonien brauchen kürzere Bebrütungszeiten als die Kolonien beim Koch'schen Plattenverfahren, so daß zwei Personen täglich 5oo Proben ansetzen und auszählen können (TOLLE et al., 1968; TOLLE et al., 1972).

Um mit einfachen Mitteln in kurzer Zeit einen groben Überblick über den Keimgehalt der Milch zu erhalten, bedient man sich der Reduktionsproben. Sie beruhen auf der Erfassung der Veränderung des Redoxpotentials der Milch, verursacht durch Bildung reduzierender Stoffwechselprodukte durch Bakterien.

Die Methylenblau - Reduktionsprobe beruht auf der Reduktion des Farbstoffs Methylenblau. Dadurch tritt eine Entfärbung des Milch-Methylenblau-Gemisches ein. Je nach der Dauer der Entfärbung, von weniger als zwei Stunden bis über 4 1/2 Stunden, unterscheidet man Qualitätsstufen I, II und III - schlecht, befriedigend und gut (KOTTERER-MÜNCH, 1972).
Die Resazurin - Reduktionsprobe beruht auf der Reduktion des blauen Resazurins, erkennbar am rosa-roten Farbumschlag und der schließlichen Entfärbung bei noch weiterer Reduktion. Hier liegen die Ergebnisse bereits nach einer Stunde vor (ebd.).
Da verschiedene Keimarten das Redoxpotential der Milch durch unterschiedlich starke "Reduktase"-Bildung verschieden beeinflussen (LEMBKE et al., 1952), kann mit den Reduktionsproben der Keimgehalt selbst nie sicher bestimmt werden. Eine Gegenüberstellung von Resazurin-Reduktionsprobe bzw. Methylenblau-Reduktionsprobe mit dem Koch'schen Plattenverfahren ergab nur einen Korrelationskoeffizienten von r = + o.47 bzw. r = +o.51 (TOLLE et al., 1966). Andere Autoren gelangten zu ähnlich geringen Korrelationen bei Gegenüberstellung des Methylenblau-Tests mit dem Breed'schen Keimzählverfahren (POFFÉ et al., 1968). Diese Schnellmethoden sind also unsicher und bieten allenfalls einen ungefähren Anhalt für die hygienische Beschaffenheit der Milch. Es sei noch erwähnt, wie sich in der Praxis die Ablösung der Gär- und Labgärprobe durch die Reduktaseprobe zur Prüfung der Käsereitauglichkeit der Milch ausgewirkt hat. Waren bisher 1o % der Milchproben in die Güteklasse I eingestuft worden, so stieg der Prozentsatz mit Einführung der Reduktaseprobe in wenigen Jahren auf 7o - 8o %. Vergleichende Untersuchungen ergaben mittels Gär- und Labgärprobe bei 8o % eine Einstufung in die Güteklasse II, bei der Reduktaseprobe jedoch ließen sich 8o % in die Güteklasse I einstufen (RENNER und KIERMEIER, 1968).
Die Nitrat - Reduktionsprobe (KANDLER, 1961) erfaßt speziell "Schmutzkeime" der Coli-aerogenes-Gruppe, die im Gegensatz zu den Milchsäurebildnern über das Ferment Nitratase verfügen. Dieses Ferment reduziert zugesetztes Nitrat zu Nitrit, das mit dem Reagenz nach Grieß-Ilosvay durch Farbumschlag nach-

gewiesen wird. Weitere Schnellmethoden zur Erfassung des Frischezustandes der Milch sind die Messung des pH-Wertes und die Alkoholprobe, sowie eine Kombination beider, die Alizarolprobe. Ein pH von 6.3 gilt als Grenzwert, bei stärkerer Säuerung wird die Milch verworfen (RENNER und KIERMEIER, 1961), ebenso bei Werten über 6.85. Die Alkoholproben beruhen auf der denaturierenden Wirkung des Alkohols auf das Milcheiweiß. Je stärker die glykolytischen Prozesse sind, desto geringer wird die Eiweißstabilität und desto weniger Alkohol führt zur Ausfällung von Eiweiß.

Alle diese Methoden haben das Überwiegen von glykolytischen Abbauprozessen zur Voraussetzung. Mit zunehmender Kühlung der Milch und entsprechender Veränderung der Keimflora trifft diese Voraussetzung jedoch nicht mehr zu. Daher führten die oben angeführten Schnellmethoden immer häufiger zu einer Fehleinschätzung der hygienischen Beschaffenheit, d.h. zu einer immer geringeren Korrelation zwischen Gesamtkeimzahl und dem Ergebnis der Schnellmethoden, da diese nur die glykolytischen, nicht aber die immer mehr in den Vordergrund tretenden proteolytischen und lipolytischen Prozesse erfaßten. HEESCHEN et al. (1969) wiesen nach, daß die Aussagekraft der Methylenblau- und Resazurin-Reduktionsproben über die Keimbelastung der Milch bereits nach 48stündiger Kühlung frischer Rohmilch erheblich sinkt. Betrug der Korrelationskoeffizient zwischen dem Logarithmus der Keimzahl und dem Ausfall der Methylenblau-Reduktionsprobe bei ungekühlter Rohmilch noch r = - o.56, so betrug er bei gekühlter Rohmilch r = - o.34 und bei der Resazurin-Reduktionsprobe ungekühlt r = - o.66 und gekühlt r = - o.25. Auch BOUCHEZ et al. (1974) gelangten zu dem Ergebnis, daß sowohl der Methylenblau-Test als auch die Bestimmung des Residual-Wasserstoffsuperoxids, sowie die Nitrat-Reduktionsprobe zu geringe Korrelationen zur tatsächlichen bakteriologischen Qualität tiefgekühlter Milch aufweisen. Allein die Gesamtkeimzahlbestimmung mittels Koch'schen Plattenverfahrens ermittelten sie als geeigneten Parameter der bakteriologischen Qualität tiefgekühlter Rohmilch.

Seit Mitte, spätestens Ende der 6oer Jahre mehren sich daher die Arbeiten, die sich mit der Bedeutung der Psychrotrophen für die Milchqualität und geeigneten Kontrollmethoden befassen.

Im wesentlichen kann man zwei Etappen der Forschung unterscheiden. In der ersten Etappe wurde versucht, die alten Methoden mit dem Ziel zu modifizieren, sie auch unter psychrotrophen Bedingungen anwendbar zu machen. In der zweiten Etappe wird nach völlig neuen Wegen gesucht, um auch bei Tiefkühlung die bakteriologisch-hygienische Wertigkeit der Milch einwandfrei beurteilen zu können.

2.2.2. Modifikation konventioneller Methoden zur Erfassung der psychrotrophen Keimflora

Eine Modifikation stellt der 12°C-Methylenblau-Test dar. Hierbei werden die Milchproben vor Zugabe des Methylenblaus 18 Stunden bei 12°C gekühlt (SVENSKA MEJERITIDNINGEN, 1973). Im Anschluß daran sollen die drei Reduktionsstufen I, II und III durchschnittlichen Gesamt- und Psychrotrophen-Keimzahlen von < 1 Mill.(I), < 10 Mill.(II) und > 10 Mill.(III) entsprechen. Der Schluß der Autoren, diese Probe sei ein geeignetes Mittel zur Kontrolle des Gesamtkeimgehalts und des psychrotrophen Keimgehalts, erscheint insofern zweifelhaft, als die Autoren betonen, daß es sich um Durchschnittswerte für die Keimzahlen der Stufen I, II und III handelt, die wegen der äußerst hohen Streuung auch stark abweichende Werte beinhalten. SEELEMANN (1966) charakterisiertediese durch Vorbebrüten modifizierte Reduktionsprobe als einen Notbehelf und schlug vor, die Reduktionsproben nicht länger zur Qualitätsbeurteilung und -bezahlung der Milch heranzuziehen.
Es wurde weiterhin für Milch mit hohem Gesamtkeimgehalt und hohem Anteil psychrotropher Keime die modifizierte Nitrat-Reduktionsprobe nach Loane beschrieben (CRITTALL und HAMLYN, 1974). Diese Methode soll zu Ergebnissen führen, die der Gesamtkeimzählung sowie der psychrotrophen Keimzählung vergleichbar sind.
Als eine Möglichkeit, auf die Psychrotrophenzählung zu verzichten, wurde der Nachweis Oxydase-positiver Keime diskutiert (KOTTERER-MÜNCH, 1972). Diese Keime umfassen die Pseudomonaden, die eigentlichen Verderber gekühlter Rohmilch. Einige Autoren kamen aber zu dem Ergebnis, daß der Nachweis Oxydase-positiver Keime kein umfassendes Bild über die hygienische Qualität der Milch verschafft und die Psychrotrophenzählung

nicht ersetzt (LÜCK et al., 1971; KNAUT und CIESLIK, 1974; KYLÄ-SIUROLA und ANTILA, 1974). LÜCK et al. begründeten das damit, daß die Pseudomonaden, also die Oxydase-positiven Bakterien nur 11.5 % der psychrotrophen Keime ausmachen. Zu anderem Ergebnis kamen ANTILA und KYLÄ-SIUROLA (1976) mit der von ihnen beschriebenen Lactocult-Methode, bei der im Gegensatz zu LÜCK unterstellt wurde, daß die stark Oxydase-positiven Pseudomonas-Arten einen zahlenmäßig bedeutenden Teil der psychrotrophen Flora der Milch ausmachen (STÜSSI, 1974). Bei dieser Methode werden Nährböden nach der IDF-Standardmethode (IDF-STANDARDS, 1958) in Milch getaucht und nach Absaugen überschüssiger Milch bei 3o°C 18 bis 24 Stunden bebrütet. Nach Behandlung mit Oxydasereagenz färben sich Oxydase-positive Kolonien blau. Vergleichsplatten verschiedener bekannter Keimdichte für Gesamtkeimzahl und Oxydase-positive Keimzahl geben einen schnellen Überblick über den jeweiligen Keimgehalt.
Die Anzahl blauer Kolonien stimmte ziemlich genau mit der im Vergleichsversuch auf Ammoniumlactatagar gewachsenen Keimzahl von Pseudomonas- und "Achromobacter"-Arten überein. Ein Vergleich der Oxydase-positiven Keime mit der nach 8 bis 1o Tagen bei + 5°C erhaltenen psychrotrophen Keimzahl ergab eine gewisse Korrelation.
Dennoch ist zum Nachweis psychrotropher Keime immer noch das Koch'sche Plattenverfahren die zuverlässigste Methode. Den Wachstumsbedingungen dieser Keime entsprechend wird bei + 5°C 7 Tage bebrütet. Alle anderen modifizierten Schnellmethoden legen die exakte Keimzählung als Maßstab für ihre Zuverlässigkeit zugrunde. Der Nachteil von Plattenguß- oder Spatelverfahren, nämlich der Arbeits- und Zeitaufwand, liegt auf der Hand. Aus diesem Grund wurden andere Möglichkeiten zum Nachweis der Keimbelastung unter psychrotrophen Bedingungen erprobt.

2.2.3. Pyruvatbestimmung zur Erfassung der Keimflora unter psychrotrophen Bedingungen

Der Grundgedanke bestand darin, vom Stoffwechselgeschehen der verschiedenen Keimarten auszugehen und den Zusammenhang zwischen Gesamtkeimzahl sowie den Stoffwechselprodukten der Glykolyse, Proteolyse und Lipolyse zu untersuchen. Erste bedeu-

tende Ergebnisse dazu lieferte die Arbeit von TOLLE et al. aus dem Jahre 1971. Hierbei wurden die für die verschiedenen Abbauvorgänge spezifischen Stoffwechselprodukte gemessen und zwar Milchsäure als Abbauprodukt der Lactose, freie Fettsäuren als Folgeprodukt der Lipolyse und Ammoniak als Leitsubstanz für die Proteolyse. Die Messung dieser Stoffwechselprodukte erfolgte durch Weiterentwicklung manueller Analysenmethoden sowie deren Transformation auf das Auto-Analyzer-System nach dem Prinzip der kontinuierlichen Durchflußanalyse. Mit einigen Einschränkungen beim Ammoniak zeigt die Tabelle 1 nach TOLLE et al. (1971) eine deutliche jedoch nicht einheitliche Zunahme dieser drei Stoffwechselprodukte entsprechend der Zunahme der Gesamtkeimzahl.

Tabelle 1 Beziehungen zwischen Gesamtkeimzahl und glyko-, proteo- und lipolytischen Veränderungen in Handelsproben pasteurisierter Trinkmilch nach TOLLE et al. (1971)

Keimzahlbereich	Anzahl Proben	Ammoniak (mg/%)	Milchsäure (mg/%)	Freie Fettsäuren (mÄqu./l)
$\leq 10^3$	5	3.45	6.25	0.34
$10^3 - 10^4$	31	5.45	5.35	0.56
$10^4 - 10^5$	372	4.91	8.38	0.76
$10^5 - 10^6$	208	5.36	19.40	0.75
$10^6 - 10^7$	138	3.90	33.71	0.74
$> 10^7$	86	4.13	45.23	0.79

Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich auf die Heranziehung einer übergeordneten Schlüsselsubstanz im intermediären Stoffwechsel der Keimflora der Milch. Solch eine Schlüsselsubstanz ist Pyruvat.

2.2.3.1. Stellung des Pyruvats im Intermediärstoffwechsel

Nach einer Modellvorstellung, die TOLLE et al. (1972) beschrieben, würden die großen Moleküle der Proteine, Kohlenhydrate und Fette durch Exoenzyme, die die Bakterien abgeben, außerhalb der Bakterienzelle in resorbierbare Spaltprodukte zerlegt, die dann aktiv durch die Plasmamembran in die Zelle transportiert würden. Intrazellulär erfolge die weitere glykolytische, proteolytische und lipolytische Verstoffwechselung

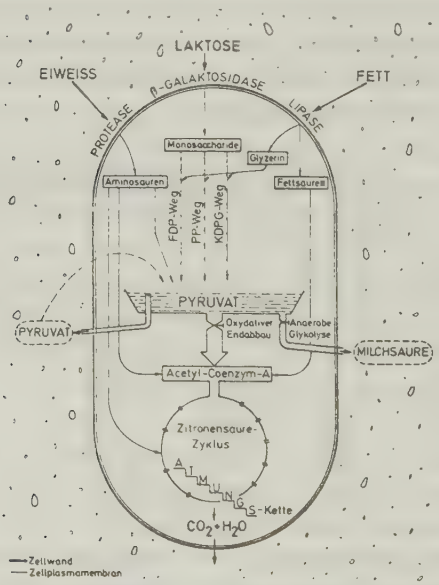
der resorbierten Spaltprodukte.

Pyruvat würde entstehen

- als eines der Endprodukte der Glykolyse,
- durch die Lipolyse, das dabei entstehende Glycerin wird in den Abbauweg der Kohlenhydrate eingeschleust,

Pyruvat könne entstehen

- während der Proteolyse, wenn entsprechende Aminosäuren desaminiert würden. Siehe Abbildung 2.



Modell der Pyruvatbildung im offenen System: Bakterienzelle – Substrat (Milch)

Abbildung 2
nach TOLLE et al.,
(1972)

Auf diese Weise entstehe ein Pyruvatsammelbecken, Pyruvat-Pool genannt, von dem aus die weitere Verstoffwechselung aerob über die Atmungskette zu CO_2 und H_2O und anaerob zu Milchsäure erfolge. Nach der erwähnten Modellvorstellung bestehe zwischen Zelle und umgebenden Medium ein Fließgleichgewicht. Pyruvat häufe sich dabei im umgebenden Medium solange an, wie in der Zelle die notwendige Enzymfolge für die weitere Verstoffwechselung des Pyruvats fehlen würde. Besonders in der exponentiellen Wachstumsphase soll Pyruvat abgegeben werden, während in der stationären und Absterbephase der Zellen die Enzyme ins

umgebende Medium gelangen sollen und deshalb mit einer intensiven Verstoffwechselung des Pyruvats gerechnet werden müsse.

Diese Vorstellung vom bakteriellen Stoffwechselgeschehen war der Ausgangspunkt, die Eignung der Pyruvatkonzentration als Parameter für die bakterielle Belastung der Milch zu untersuchen. Von besonderer Bedeutung war vor allem die Aussicht, nicht nur glykolytische, sondern ebenso proteolytische und lipolytische Aktivitäten der psychrotrophen Keimflora der gekühlten Milch erfassen zu können und somit einen Parameter für die gesamte biochemische Aktivität der Mikroflora und damit für die bakteriologische Wertigkeit der Milch zu erhalten.

2.2.3.2. Ergebnisse der Pyruvatuntersuchung der Milch

Erste grundlegende Untersuchungen über das Verhalten des Pyruvats in der Milch, bes. über die Abhängigkeit des Pyruvatgehalts vom Keimgehalt sowie von anderen Einflußgrößen, veröffentlichten TOLLE et al. und WERNERY aus dem Institut für Hygiene der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel im Jahre 1972. Dabei wurde der Pyruvatgehalt durchweg mittels der kontinuierlichen Durchflußanalyse im Auto-Analyzer-System gemessen und kulturell mit Koch'schem Plattenverfahren ermittelt, z.T. unterstützt durch die Computer-Bild-Analyse.

2.2.3.2.1. Untersuchungstechnische Vorteile der Pyruvatanalyse

Einen grundlegenden Vorteil bietet die Messung des Pyruvates, weil es eine homogen verteilte lösliche Verbindung ist, die im Gegensatz z.B. zur Fett-, aber auch Keimzahlbestimmung, keinerlei besondere Anforderungen an eine repräsentative Probeentnahme stellt.
Eine wichtige Voraussetzung zur praktischen Durchführung der Pyruvatanalyse ist die Konservierung der Milchproben. Mit Formalin kann eine Milchprobe 48 (WERNERY, 1972) bzw. 24 Stunden (STAHLHUT-KLIPP, 1975) ohne Beeinträchtigung der Pyruvatkonzentration fixiert werden. Der Nachteil besteht darin, daß an der so behandelten Milch einige andere Untersuchungen nicht mehr durchgeführt werden können, wie z.B. der Hemmstofftest oder die Bestimmung des Eiweißgehalts. Die Pyruvatwerte nach der Konservierung der Proben mit Formalin waren mit den

Ausgangswerten nach 24stündiger Aufbewahrung mit r = + o.97 und nach 48stündiger Aufbewahrung mit r = + o.94 korreliert. (TOLLE et al., 1972). x)

2.2.3.2.2. Einfluß sekretorischer Faktoren auf den Pyruvatgehalt

Eine vergleichende Untersuchung von 2o41 Viertelgemelken ergab keinen Zusammenhang zwischen Pyruvatgehalt und laktationsphysiologischen Faktoren, wie Laktationsnummer, -stadium oder Viertelposition. Ein geometrischer Pyruvatmittelwert von 1.46 ppm stand einem Zellgehalt von 585 ooo/ml im Mittel

x)
Im Zusammenhang mit diesen Daten sei auf die kritischen Anmerkungen von WASSERFALL (1975) zur Berechnung von Korrelationen verwiesen. Danach stellt der Korrelationskoeffizient lediglich ein Maß für die Enge der zwischen zwei Zufallsvariablen bestehenden Beziehung dar. Ein Wert in der Nähe von 1 weist nur darauf hin, daß die Beziehung zwischen den beiden Variablen sehr eng ist. Er kann aber nicht als Maß für die Aussagekraft oder Wiederholbarkeit von Methoden angesehen werden. An den obigen Untersuchungen kritisiert WASSERFALL, daß aus der Höhe des Korrelationskoeffizienten von r = + o.94 bzw. r = + o.97 geschlossen wird, durch Formalinzusatz werde der Pyruvatgehalt nicht verändert. Die Punktwolke, die aus der Gegenüberstellung der Pyruvatwerte vor und nach der Zusetzung von Formalin resultiert, steht mit ihrer breiten Streuung in auffälligem Gegensatz zur Aussage, der Pyruvatgehalt bleibe nach Formalinzusatz stabil. Auch die "Aussagekraft" zweier verschiedener Untersuchungsmethoden (z.B. der elektronischen Mikrokoloniezählung und der Koloniezählung im Koch'schen Plattenverfahren) kann nach WASSERFALL nicht dadurch ermittelt werden, daß man Korrelationen berechnet und zum Maß für die Genauigkeit macht. Stattdessen müßten zur Ermittlung der Variabilität aus den Ergebnissen einer größeren Zahl von Untersuchungen an gleichen Proben für die verschiedenen Methoden die Standardabweichungen oder Varianzen berechnet und die Parameter mittels geeigneter Tests verglichen werden.

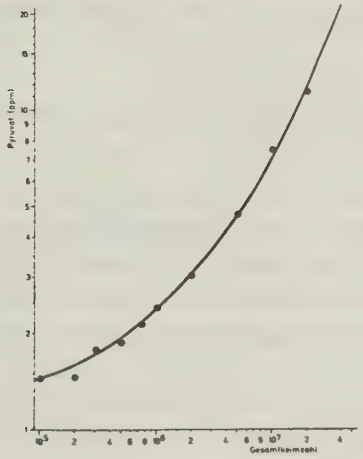
gegenüber (TOLLE et al., 1972; WERNERY, 1972). Höhere Zellgehalte gehen zwar mit einem Pyruvatanstieg einher, aber es wird vermutet (ebd.), daß dieser weniger mit der Zellzahl als mit der vermehrten Stoffechselaktivität der Mastitiserreger zusammenhängt.

2.2.3.2.3. Pyruvat-Basiswert

Steril gewonnene Rohmilch eutergesunder Tiere ist keimfrei. Sie weist jedoch bereits einen gewissen Pyruvatgehalt auf, den sog. "Basiswert". Er liegt im Bereich von o.5 - 1.o ppm (SUHREN, 1973), nach neueren Untersuchungen mit empfindlicherer Analytik nicht über o.5 ppm (TOLLE, 1973). Höhere Pyruvatwerte sind auf bakterielle Aktivität zurückzuführen, und zwar auf Keimzahlen zwischen 5o ooo und 1oo ooo/ml (HEESCHEN et al., 1974).

2.2.3.2.4. Entwicklung von Keim- und Pyruvatgehalt in Rohmilch

Frische Rohmilch weist nach den Untersuchungen verschiedener Autoren im Mittel folgende Pyruvatgehalte auf: 1.6 ppm (SUHREN, 1973), 1.5 ppm (SADINI, 1972), 1.4 ppm (HEESCHEN et al., 1974) bzw. 1.3 ± o.5 ppm (WIESNER, 1975).



Beziehungen zwischen Pyruvatgehalt und Gesamtkeimzahl in Sammelmilch (Untersuchung der Proben am Tag der Probenahme = 1709)

Abbildung 3
nach TOLLE et al., (1972)

Frische Sammelmilch, nicht älter als einen Tag, weist im geometrischen Mittel weniger als 2.5 ppm Pyruvat auf (WERNERY, 1972). Mit zunehmendem Keimgehalt nimmt der Pyruvatgehalt zu. Das Ergebnis einer Untersuchung von 1709 frischen Sammelmilchproben zeigt die Abbildung 3 nach TOLLE et al., (1972) und WERNERY, (1972). Die relativ niedrige Korrelation der 1709 Proben von r = + 0.57 läßt auf eine mesotrophe, vorwiegend glykolytische Keimflora schließen (WERNERY, 1972).
Die Tabelle 2 zeigt die Beziehungen zwischen Keim- und Pyruvatgehalt im Verlauf einer Zeitreihe über vier Tage bei 9°C.

Tabelle 2 (nach WERNERY, 1972)

Beziehungen zwischen Keim- und Pyruvatgehalt (Standversuch 9°C — Inkubationszeit 4 Tage) Sammelmilch

Inkubationsdauer in Tagen	Anzahl Proben	Pyruvat (ppm) $\bar{x}_G$	$\bar{x}_A$	s	Keimzahlbereich $\bar{x}_G$
0	320	2,25	2,60	1,516	$2,95\times10^5$
1	320	4,34	5,34	3,687	$9,04\times10^5$
2	295	9,13	12,04	9,467	$4,64\times10^6$
3	250	11,68	12,88	6,240	$2,82\times10^7$
4	111	11,02	11,45	3,105	$3,82\times10^7$

Auch hier nimmt mit steigendem Gesamtkeimgehalt der Pyruvatgehalt zu. Die hohe Standardabweichung s weist auf die relativ große Streuung der Pyruvatwerte innerhalb der einzelnen Tage hin.

2.2.3.2.5. Beziehungen zwischen Reduktionsvermögen, Pyruvatgehalt und Gesamtkeimgehalt

Zwischen Pyruvatgehalt und den Ergebnissen der Resazurin-Reduktionsprobe von 1709 Sammelmilchproben wurde eine Korrelation von r = + 0.58 ermittelt (WERNERY, 1972). Die Beziehung zwischen Pyruvatgehalt und dem Reduktionsvermögen der Sammelmilchen zeigt die Tabelle 3.

Tabelle 3 (vereinfacht, nach WERNERY, 1972)

Reduktionsstufe	I:	1.99 ± 1.15 ppm Pyruvat
"	II:	3.24 ± 2.49 ppm "
"	III:	6.95 ± 5.68 ppm "

Trotz der äußerst großen Standardabweichung ist zu erkennen: zunehmendes Reduktionsvermögen der Milch, eine Folge glykolytischer Keimaktivität ungenügend gekühlter Milch, geht mit einer Erhöhung des Pyruvatgehalts einher. Damit könnte der Pyruvatgehalt neben proteolytischen auch glykolytische Abbauvorgänge widerspiegeln.

Werden Pyruvatgehalt und Reduktionsvermögen in Relation zum Gesamtkeimgehalt der Sammelmilchproben gesetzt, dann ergeben sich Korrelationskoeffizienten von r = + o.57 und r = + o.51 (WERNERY, 1972). Für diese ungenügend gekühlten Milchen mit vorwiegend glykolytischer Keimflora hat die Pyruvatbestimmung also etwa die gleiche Aussagekraft wie die Reduktionsprobe (ebd.).

Die Tabelle 4 zeigt die Korrelation zwischen Pyruvatgehalt und Resazurin-Reduktionsprobe einerseits und dem Gesamtkeimgehalt andererseits in Abhängigkeit von verschiedenen Kühlsystemen:

Tabelle 4 (nach TOLLE et al., 1972)

Korrelationen zwischen der Gesamtkeimzahl und Pyruvatgehalt sowie Resazurinreduktion von Sammelmilch in Abhängigkeit von verschiedenen Kühlsystemen

Art der Kühlung	Gesamtkeimzahl zu Resazurin-reduktion r =	Pyruvat r =	Anzahl Proben
Keine	0,49	0,29	109
Tauchkühler	0,46	0,51	102
Kühlwanne	0,25	0,67	39

Mit zunehmender Kühlung verringert sich die Relation zwischen Keimzahl und Reduktionsprobe, die Relation zwischen Keimzahl und Pyruvatgehalt nimmt zu. Der Parameter Pyruvat spiegelt offensichtlich in besonderem Maße die biochemische Aktivität der Keimflora unter psychrotrophen Bedingungen wider (ebd.).

2.2.3.2.6. Zur Abhängigkeit der Pyruvatzunahme von der Keimvermehrung

Mit zunehmendem Keimgehalt steigt der Pyruvatgehalt der Milch. Die pro Bakterium bzw. koloniebildender Einheit gebildete Pyruvatmenge ist jedoch nicht konstant. Sie sinkt mit zunehmender Gesamtkeimzahl. Nach HEESCHEN et al.,(1974) bilden 1oo ooo koloniebildende Einheiten pro Kolonie im Mittel noch $5 \times 1o^{-5}$ (± 65 %) ppm Pyruvat. 1 Millionen koloniebildende Einheiten bilden dagegen pro Kolonie nur noch $1 \times 1o^{-5}$ (± 65 %) ppm Pyruvat. Die Ursache für diese Abnahme liegt im bestehenden Fließgleichgewicht zwischen der Zelle und dem umgebenden Medium. Je größer der Pyruvatgehalt im umgebenden Medium bereits ist, desto weniger Pyruvat wird abgegeben. Ein Experiment bestätigt das. Setzt man identischen Milchproben mit gleichen Keimzahlen unterschiedliche Mengen Pyruvat hinzu, so ist die von derselben Keimzahlzunahme verursachte Pyruvatzunahme umso geringer, je mehr Pyruvat vor dem Versuch zugesetzt wurde (HEESCHEN et al., 1974). Bei linearem Maßstab ergibt ein Vergleich von Keimzuwachs und zugehöriger Pyruvatzunahme also eine Kurve, deren Steigung kontinuierlich abnimmt.

2.2.3.2.7. Einfluß der Keimart auf den Pyruvatgehalt

Keimfreie Rohmilchen wurden mit Reinkulturen von Pseudomonaden, Enterokokken, Lactisstreptokokken und Coliformen beimpft und bei 6°C inkubiert (TOLLE, 1973; WERNERY, 1972). Die Pseudomonaden, die bei dieser Temperatur die höchste Wachstumsrate aufwiesen, bildeten auch die größte Pyruvatmenge. Siehe dazu Abbildung 4 nach TOLLE (1973). Die bisherigen Versuchsergebnisse sollen dafür sprechen, daß weitgehend unabhängig von der Bakterienspecies insbesondere auch unter psychrotrophen Bedingungen Keimzahl und Pyruvat weitgehend konform verlaufen (TOLLE, 1973).

2.2.3.2.8. Pyruvat bei der Pasteurisierung

Von besonderer Bedeutung des Parameters Pyruvat ist dessen Eigenschaft, quantitativ nahezu unverändert die Pasteurisierung

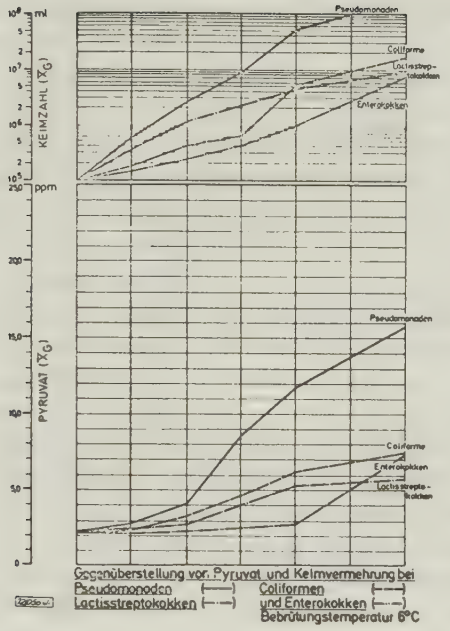


Abbildung 4 nach TOLLE (1973)

zu überstehen. Die Pyruvatwerte vor und nach der Pasteurisierung korrelieren mit r = +o.96 bei der Kurzzeiterhitzung (71°C/4o sec) und r = +o.97 bei der Hocherhitzung (85°C/1o sec) (WERNERY, 1972). Damit kann in der pasteurisierten Trinkmilch mit der Pyruvatbestimmung auch die mikrobiologische Belastung aus dem Rohmilchbereich nachgewiesen werden. 1973 wurden in einer Repräsentativerhebung 56oo Milchproben fortlaufend von der Erzeugung bis zum Verbrauch auf den Pyruvatgehalt und davon 44oo Proben auf den zugehörigen Gesamtkeimgehalt untersucht (WERNERY et al., 1974). Dabei stieg der Pyruvatgehalt von 1.4 ppm im Erzeugerbereich auf 3.5 ppm vor der Pasteurisierung, entsprechend die Gesamtkeimzahl von 4.1 x $1o^5$/ml auf 2.9 x $1o^6$/ml. Nach der Pasteurisierung betrug der Pyruvatgehalt im geometrischen Mittel 2.5 ppm - die leichte Abnahme lag an der Zumischung pyruvatarmer frischer Rohmilch unmittelbar vor der Pasteurisierung. Die Keimzahl nahm auf 4.9 x $1o^4$ pro ml ab. Pyruvat- und Keimgehalt stiegen im Handelsbereich auf 3.1 ppm bzw. 7.8 x $1o^4$ Keime/ml an. Diese Ergebnisse zeigen, daß insbesondere während des Transports und der Vorstapelung, also zwischen Milcherzeugung und Pasteurisierung, die höchsten Keimzahl- und Pyruvatzunahmen auftreten. In diesem Bereich müssen vor allem die Bestrebungen ansetzen, die Keimzunahme auf ein Minimum zu reduzieren. Dazu wird gefordert, die Milch bei den Meiereien so kurz wie möglich zu lagern, und zwar bei nicht mehr als + 2°C (HADLAND und HØYE, 1974). Unter diesen Bedingungen soll sich die Milch pasteurisiert bis zu zwei Wochen halten (ebd.).

2.2.3.2.9. Entwicklung von Keim- und Pyruvatgehalt in pasteurisierter Trinkmilch

WERNERY (1972) führte mit pasteurisierten Trinkmilchen Standversuche bei 6°, 9° und 12°C über bis zu vier Tage durch. Er stellte mit der Zunahme der Gesamtkeimzahl einen deutlichen Pyruvatanstieg fest. Dabei war die Streuung im 6°C-Standversuch am geringsten und im 12°C-Standversuch am größten.

2.2.3.2.1o. Versuch der Festlegung von Pyruvatgrenzwerten zur Qualitätsüberwachung der Milch

Am Institut für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Hochschule Hannover wurde der Versuch unternommen, Empfehlungen für einen Grenzwert für Pyruvat in Rohmilch zu geben, um einen Anhaltspunkt für die Qualitätsüberwachung der Rohmilch zu erhalten (WIESNER, 1975). Dazu wurden 293 Rohmilchproben aus 69 Beständen u.a. auf den Pyruvatgehalt und die Anzahl coliformer Keime untersucht. Aus dem arithmetischen Mittel des Pyruvats von 1.3 ± o.5 ppm wurden drei mögliche Grenzwerte für den Pyruvatgehalt festgesetzt und in Beziehung zu drei den praktischen Erfahrungen entsprechenden Grenzwerten für den Gehalt an coliformen Keimen, den "Schmutzindikatoren", gesetzt. Unterhalb des Grenzwertes von 1.8 ppm lagen sowohl 9o % aller Proben mit weniger als 1oo Coliformen pro ml, als auch 91 % aller Proben mit mehr als 1ooo Coliformen pro ml. Wurde der Grenzwert für Pyruvat bei 1.3 ppm angesetzt, so wurden die Hälfte aller Proben bezüglich des Coliformengehalts richtig bzw. falsch eingeschätzt (ebd.).

2.2.3.2.11. Der Pyruvatdifferenzwert

Einen geeigneten Parameter, um das Verderbsstadium der Milch abzuschätzen, bietet die Messung des Pyruvatdifferenzwertes. Dazu wird der Pyruvatgehalt der Probe im Abstand von 48 Stunden (HEESCHEN et al., 1974) oder 72 Stunden (SUHREN et al., 1975) zweimal gemessen und in der Zwischenzeit bei 12°C bebrütet. Aus beiden Pyruvatmessungen wird die Differenz gebildet. Der Pyruvatdifferenzwert zeigt eine deutliche Beziehung zu anderen Parametern der Haltbarkeit der Milch, wie der Eiweißstabilität, Geschmacks- und Geruchsmerkmalen. Bei einem Pyruvatdifferenzwert von 4.4 ppm ist die doppelte Alkoholprobe (zur Messung der Eiweißstabilität) bereits nach 2 Tagen positiv, bei einem Pyruvatdifferenzwert von 1.5 ppm jedoch erst nach 5 Tagen. Oder: bei einem Pyruvatdifferenzwert von 4.o ppm treten bereits am 2. Tag Geschmacksabweichungen auf, bei 1.5 ppm dagegen erst nach 4 Tagen.
Je geringer also der Pyruvatdifferenzwert ist, desto besser ist die Haltbarkeit der Milch. Während eine einmalige Pyru-

vatuntersuchung nur ein statisches Bild der momentan bestehenden bakteriologischen Belastung der Milch vermittelt, wird mit dem Pyruvatdifferenzwert die Entwicklung der vonstatten gehenden bakteriologischen Aktivität, sozusagen die "Geschwindigkeit" der Qualitätsabnahme der Milch erfaßt. Allerdings streuen auch hier die Ergebnisse noch sehr. Die Meiereien könnten dennoch mit diesem Parameter das Verderbnisrisiko der Milch und die Haltbarkeit der Produkte besser kalkulieren als mit der einfachen Keimzählung (SUHREN et al., 1975; HEESCHEN, 1972).

2.2.3.2.12. Einschätzung der Vor- und Nachteile der Pyruvatbestimmung als Kriterium der hygienischen Beschaffenheit der Milch

Am 19. März 1975 wurden auf einer Informationstagung in Hannover die bis dahin gemachten Erfahrungen mit der Pyruvatanalytik zusammengefaßt (STAHLHUT-KLIPP und KRONENBERGER, 1975). Dabei wurde festgehalten, daß der Nachweis von Stoffwechselprodukten der Mikroorganismen besser die hygienische Wertigkeit der Rohmilch kennzeichnet als die Keimzahl.
Nach wie vor ungelöst ist das Problem, Pyruvatgrenzwerte für die Beurteilung der Milchqualität sowie ihrer Verarbeitungsfähigkeit festzulegen. Die Schwierigkeit, Pyruvatgrenzwerte mit analogen Colititern zu koordinieren, beleuchtet noch einmal das Problem, das bereits die Arbeit WIESNERs (1975) zur Grenzwertfestlegung für Pyruvat aufzeigte. Zwei Betriebe lieferten über drei Monate hinweg Milch mit durchschnittlich o.9 bis 1.8 ppm bzw. o.9 bis 1.4 ppm Pyruvat. Die Milch des ersten Betriebes hatte Gesamtkeimzahlen von 1o ooo bis 1oo ooo/ml und weniger als 1oo Coliforme/ml. Die des zweiten dagegen hatte ca. 3oo ooo Keime/ml und 8ooo - 3o ooo Coliforme pro ml - bei sogar etwas niedrigerem Pyruvatgehalt. Vergleicht man die Milchen einzelner Tage der beiden Betriebe miteinander, so finden sich für Pyruvatwerte um 1.o ppm Gesamtkeimzahlen, die bis um das 3ofache variieren.
Dieser Mangel an Korrelation bestätigt, daß Pyruvatgehalt und Pyruvatbildung nicht von der Anzahl der Keime allein abhängen. Als weitere Einflußgrößen auf den Pyruvatgehalt der Milch sind Keimart und Inkubationsbedingungen anzusehen (WERNERY, 1972).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material

Es wurden untersucht:

1.
Rohmilch aus Nauen und Brandenburg (DDR) sowohl vor als auch nach der Pasteurisierung in Berlin. Die Milch war maximal einen Tag alt. Es ist aber nicht auszuschließen, daß auch ältere Rohmilchen zur Anlieferung kamen. Diese Milch, die mit dem Tankwagen gegen Mittag in der Meierei-Zentrale Berlin eintraf, setzte sich aus dem Morgengemelk desselben und dem Abendgemelk des vorigen Tages zusammen.

2.
Trinkmilch aus der Bundesrepublik, dort bereits pasteurisiert, sowohl vor als auch nach der zweiten Pasteurisierung in Berlin. Die Tankwagen trafen je nach ihren Herkunftsorten Schleswig-Holstein, Niedersachsen, Hessen und Bayern zwischen Mittag und Abend in der Meierei-Zentrale Berlin ein. Die Milch war mindestens einen Tag älter als die Rohmilch aus der DDR.

3.
Vorzugsmilch der Domäne Dahlem in Berlin (West). Es handelte sich um eine völlig unbehandelte Rohmilch hygienisch intensiv überwachter Kühe. Diese Milch wurde morgens bereits abgepackt gekauft, sie setzte sich aus dem Morgengemelk desselben und dem Abendgemelk des vorigen Tages zusammen.

3.2. Methodik

3.2.1. Probenentnahme

Die Milchproben aus der Bundesrepublik und der DDR wurden entweder gegen Mittag direkt dem Tankwagen nach Ankunft in der Meierei-Zentrale oder am Abend zwischen 21 und 22 Uhr dem Sammelgefäß des Erhitzers direkt vor der Pasteurisierung entnommen. In diesem Fall wurde die Milch auch nach der Pasteurisierung untersucht, indem sie dem dafür vorgesehenen Probehahn des Erhitzers entnommen wurde, und zwar etwa eine

Minute nach der Milchentnahme aus dem Sammelgefäß. Etwa eine Minute benötigt eine bestimmte Milchmenge, um den Erhitzer zu passieren. Es kam also jeweils etwa dieselbe Milch vor und nach der Pasteurisierung zur Untersuchung.
Die Milch wurde mit einer Schöpfkelle bzw. dem Probehahn entnommen und in sterile 50 ml-Flaschen oder 500 ml-Standgefäße gefüllt. Schöpfkelle, Probehahn und Flaschenrand wurden vor der Entnahme abgeflammt, ebenso der Verschluß der Flaschen und Standgefäße, bevor diese verschlossen wurden.
Die Milch aus Tankwagen und Sammelgefäß wurde unmittelbar nach der Entnahme in einem Kühlbehältnis bei 4-5°C gelagert, die heiße Milch aus dem Probehahn des Erhitzers, nachdem das Probengefäß unter einem kalten Wasserstrahl abgekühlt worden war. Die mittags entnommenen Proben wurden anschließend in dem Kühlbehälter ins Institut gefahren und dort gegen 15 Uhr untersucht. Die abends vor und nach der Pasteurisierung entnommenen Proben wurden über Nacht im Kühlschrank bei maximal 5°C aufbewahrt, am nächsten Morgen im Kühlbehälter ins Institut gebracht und zwischen 8 und 9 Uhr untersucht. Zwei Milchproben, die nach der Ultrahocherhitzung untersucht wurden, wurden in 1-Liter-Verpackungen ins Institut gebracht, eine Entnahme dieser H-Milch vor der Abpackung war nicht möglich. Ebenso wurden die Vorzugsmilchen in der Verbraucherpackung gekauft, ins Institut gebracht und untersucht.

3.2.2. Kulturelle Untersuchungen

Von jeder Milchprobe wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen mit sterilem Peptonwasser hergestellt und entsprechende Nährböden im Tropfverfahren mit jeweils 4 x 0.05 ml dreier infrage kommender Verdünnungsstufen der Milch beimpft. Nach dem Trocknen wurden die Nährboden-Platten die für die jeweilige Untersuchung vorgeschriebene Zeit im Brutschrank oder Kühlschrank bebrütet. Nach dem Bebrüten wurden die Kolonien solcher zwei Verdünnungsstufen ausgezählt, die nicht mehr als 100 und nicht weniger als 5 Kolonien aufwiesen (REUTER, 1968). Aus der Anzahl der Kolonien zweier aufeinanderfolgender Verdünnungsstufen wurde der Keimgehalt nach FARMILOE et al.

(1954) unter stärkerer Berücksichtigung der Koloniezahl der unteren Verdünnungsstufe ermittelt. Ein Beispiel:
o.1 ml der Verdünnungsstufe $1o^3$ ergaben 95 Kolonien.
o.1 ml der Verdünnungsstufe $1o^4$ ergaben 11 Kolonien.
Berechnung: $(95 + 11) \times \frac{1o}{11} = 96.36$
Multipliziert mit der unteren Verdünnungsstufe $1o^3$ und mit 1o (um den Keimgehalt pro 1.o ml zu erhalten) ergibt einen Keimgehalt von $96.36 \times 1o^3 \times 1o = 9.64 \times 1o^5$/ml.

Die Differenzierung des Keimgehalts erfolgte unter Heranziehung folgender Nährmedien:

Nachgewiesene Mikroorganismen	Nährmedium	Bebrütung
Gesamtkeimgehalt mesophil	Iso-Agar nach REUTER (1968)	3o°C, 18-24 Stunden
Gesamtkeimgehalt psychrotroph	Iso-Agar	4-5°C, 1 Woche
"Thermophile"Keime x)	Iso-Agar	43°C, 18 Stunden
Oxydasepositive Keime	Iso-Agar	4-5°C, 1 Woche, dann Anfärben der Oxydasepositiven mit Kovacz-Reagenz
Enterokokken	Zitrat-Azid-Tween-Karbonat-Medium(ZATK) nach REUTER (1968)	37°C, 18 Stunden
Enterobacteriaceae	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar nach MOSSEL et al. (1962, 1963)	37°C, 18-24 Stunden
Coliforme und Coli-Bakterien	Endo-S-Agar nach ENDO (19o3)	37°C, 24 Stunden
	Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar	37°C, 2o-24 Stunden
Mikrokokken, eigelbpositive Staphylokokken	Kaliumrhodanid-Actidione-Natriumazid-Eigelb-Pyruvat-Agar (KRANEP-Agar) nach SINELL und BAUMGART (1967)	37°C, 48 Stunden, anschließend 24 Stunden bei Zimmertemperatur

x)
Aus technischen Gründen war eine Bebrütung bei höheren Temperaturen nicht möglich. Die dabei ermittelten Zahlen sind nur unter Vorbehalt als "Thermophilen"-Zahl zu werten. S. Fußn. S. 39

Der Rest der kulturell untersuchten Milchprobe wurde für die weitere Untersuchung auf den Pyruvatgehalt eingefroren.

Um die Entwicklung des Keim- und Pyruvatgehalts ein und derselben Milchprobe über mehrere Tage verfolgen zu können, wurde bereits bei der Probeentnahme eine größere Menge Milch entnommen und in 500-ml-Standgefäße gefüllt. Diese Proben wurden je nach Dauer des Standversuchs einige Tage bei 4-5°C aufbewahrt. Nach Bedarf wurde den Standgefäßen etwa 50 ml Milch für die kulturelle und die Pyruvatuntersuchung an darauffolgenden Tagen entnommen. Dadurch wurde sichergestellt, daß jede Folgeuntersuchung einer Milch die Entwicklung von Keim- und Pyruvatgehalt derselben Milch widerspiegelt. Vor der Öffnung des Standgefäßes für die Entnahme einer weiteren Probe sowie vor dem erneuten Verschluß wurde der Deckel abgeflammt.

3.2.3. Pyruvatbestimmung

3.2.3.1. Prinzip

Wird in eine pyruvathaltige Lösung reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) gegeben, so wird Pyruvat in Anwesenheit des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert.

$$\text{PYRUVAT} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-LACTAT} + \text{NAD}^+$$

Der Verbrauch an NADH ist der Pyruvatmenge äquivalent und wird spektralphotometrisch bestimmt, indem die Abnahme der Absorption (Extinktionsdifferenz) von durchfallendem Licht der Wellenlänge 366 nm gemessen wird, die mit der Oxydierung von NADH zu NAD einhergeht.

3.2.3.2. Auswahl der Methode und der Reagenzien

Es gibt mehrere Methoden der manuellen Pyruvatbestimmung, die sich aber lediglich im Volumen der eingesetzten Probelösung unterscheiden. Hier wurde nach der Methode von CZOK und LAMPRECHT (1970) mit der Biochemica-Test-Combination (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, 1972) gearbeitet, bei der ein großes Volumen der Probelösung zum Einsatz kommt. Dadurch ergeben auch geringe Pyruvatkonzentrationen ausreichend große Extinktions-

differenzen, wodurch eine hinreichende Genauigkeit der Pyruvatmessung erzielt wird.
Aus Kostengründen wurden größere Mengen kristallinen NADHs und höher konzentrierte LDH-Lösung benutzt und in den erforderlichen Konzentrationen selbst hergestellt.
Folgende Lösungen kamen bei der Pyruvatbestimmung mit der Methode der Biochemica-Test-Combination zur Verwendung:

Lösung 1 o.7 M Trikaliumphosphat-7-hydrat ($K_3PO_4 \times 7\ H_2O$)
Molekulargewicht: 338.39

1.o M $K_3PO_4 \times 7\ H_2O$ = 338.39 g kristallines $K_3PO_4 \times 7\ H_2O$/l
o.7 M " = 236.87 g " " " "

Diese erforderliche Menge wurde mit einer Präzisionswaage (bis auf 1 mg genau) eingewogen, in einen geeichten Rundkolben gegeben und mit Aqua dest. bis auf 1 Liter aufgefüllt.

Lösung 2 2.5 mM NADH
Molekulargewicht von NADH: 665.42

Zur Verfügung stand das Dinatriumsalz NADH-Na_2 mit einem Molekulargewicht von 7o9.42.

1.o M NADH = 1.o M NADH-Na_2 = 7o9.42 g NADH-Na_2/l
2.5 mM NADH = 2.5 mM NADH-Na_2 = 44.34 mg NADH-Na_2/25 ml

44.34 mg NADH-Na_2 wurden in einen 25 ml-Rundkolben gegeben und mit Aqua dest. bis auf 25 ml aufgefüllt.

Lösung 3 2 mg LDH/ml

Zur Verfügung stand eine Lösung mit einer Konzentration von 1o mg/ml, die mit 3.2 M Ammoniumsulfat-Lösung verdünnt wurde.

1.o M $(NH_4)_2SO_4$ = 132.14 g/l
3.2 M " = 422.85 g/l

2 ml LDH (1o mg/ml) + 8 ml 3.2 M $(NH_4)_2SO_4$ = 1o ml LDH (2 mg/ml)

3.2.3.3. Verfahren

3.2.3.3.1. Entfettung und Enteiweißung

Um klare Lösungen zu erhalten wurde die Milch 1o min bei 3ooo U/min zentrifugiert und nach Entfernung des Rahms der

Überstand in ein Becherglas gegeben. Die entfettete Milch wurde mit eiskalter 1 N Perchlorsäure im Verhältnis 1 : 1 gut durchmischt und bei 10000 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Das ausgefällte Eiweiß wurde abfiltriert.

3.2.3.3.2. Pufferung zur photometrischen Bestimmung

10 ml der klaren Lösung wurden im Reagenzglas mit 5 ml der Lösung 1 durchmischt und etwa eine Stunde im Eiswasserbad stehen gelassen. Der äußerst feine Niederschlag wurde mit dem Faltenfilter Nr. eh 602 (Schleicher u. Schüll) abgefiltert und das Filtrat im Wasserbad auf 25°C erwärmt. Die so vorbereitete Probelösung wies den nach Auskunft der Boehringer Mannheim GmbH erforderlichen pH von 7.0 - 7.4 auf.

3.2.3.3.3. Bestimmungsansatz

3.0 ml des auf 25°C erwärmten Filtrats wurden in eine Glasküvette von 1 cm Schichtdicke pipettiert und 0.3 ml Lösung 2 zugegeben. Nach der Durchmischung mit einem Plastikspatel wurde die Küvette in den auf 25°C temperierten Küvettenhalter des Spektralphotometers geschoben und bei einer Wellenlänge von 366 nm die Extinktion "E1" gemessen. Anschließend wurden 0.03 ml der Lösung 3 hinzugegeben, durchmischt und nach genau 5 Minuten die Extinktion "E2" gemessen. Daraus wurde die Extinktionsdifferenz dE = E1 - E2 gebildet. Nach der Biochemica-Test-Combination errechnete sich die Pyruvatkonzentration(c) in der Milch nach: c = dE x 82.1 ppm.

3.2.3.3.4. Extrapolation der Meßwerte

Für die Erstellung einer Eichkurve (s.u.) wurden insgesamt 80 Pyruvatmessungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die Reaktion nach Zugabe der Lösung 3 nie nach 5 Minuten zum Stillstand gekommen war. Der Abfall der Extinktion war zwar innerhalb der 5 Minuten der Zeitreaktion am größten, aber auch in den folgenden beobachteten 10 bis 15 Minuten fiel die Extinktion weiter ab. Den Idealfall, also Konstanz der Extinktion nach 5 Minuten, demonstriert die Abbildung 5.

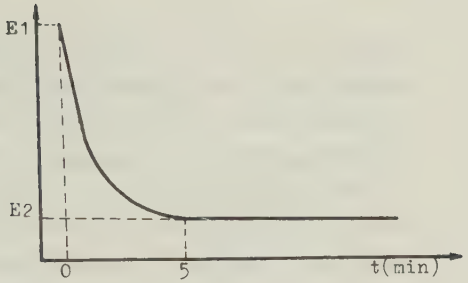


Abbildung 5

In der Praxis ergaben weitere Ablesungen über 5 Minuten hinaus einen schwachen aber stetigen annähernd linearen Abfall der Extinktion. Der erhaltene 5 Minuten-Wert entsprach daher nicht der eigentlichen Extinktion E2, er sei $\bar{E}2$ genannt. $\bar{E}2$ wurde extrapoliert (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, Test-Fibel-Einlage zur Biochemica-Test-Combination), indem durch den 5 Minuten-Wert und alle weiteren gegen die Zeit aufgetragenen Extinktionswerte jeweils eine Regressionsgerade gelegt und bis zum Zeitpunkt des Starts der Reaktion zurück verlängert wurde. Der so erhaltene Wert entsprach der eigentlichen Extinktion E2. Siehe Abbildung 6.

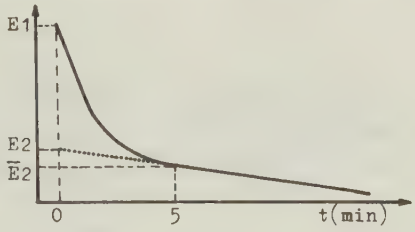


Abbildung 6

Um für die Pyruvatbestimmung in der Milch nicht jeden $\bar{E}2$-Wert erneut extrapolieren zu müssen, wurde aus allen 80 Regressionsgeraden die durchschnittliche Steigung bestimmt und daraus ein durchschnittlicher Korrekturwert $e = E2 - \bar{E}2$ errechnet, um den dann jede nach 5 Minuten erhaltene Extinktion $\bar{E}2$ vergrößert wurde. Also:

$$dE = E1 - E2$$
$$dE = E1 - \bar{E}2 - e \qquad E2 = e + \bar{E}2$$

Der durchschnittlichen Steigung sämtlicher Regressionsgeraden entsprach ein Korrekturwert von $e = 0.0030 \pm 0.0003$.
Noch ein weiterer Wert mußte von dE abgezogen werden:
Die photometrische Untersuchung von 8 Leerwerten ergab nach

Zugabe der Lösung 3 (LDH) einen Extinktionsabfall von durchschnittlich o.oo9. Dieser Abfall hat seine Ursache also nicht in einer chemischen Umsetzung von Pyruvat, sondern ist ausschließlich durch die Zugabe des LDH begründet, das selbst die Extinktion verändert. Da überall LDH hinzugegeben wurde, waren alle Extinktionsdifferenzen dE um o.oo9 zu groß. Deshalb wurden die Extinktionsdifferenzen aller Pyruvatmessungen der Milch nach der Formel bestimmt:

$$dE = E1 - \overline{E}2 - o.oo3 - o.oo9$$
$$dE = E1 - \overline{E}2 - o.o12$$

Aus dem so erhaltenen dE-Wert wurde die Pyruvatkonzentration wie beschrieben errechnet.

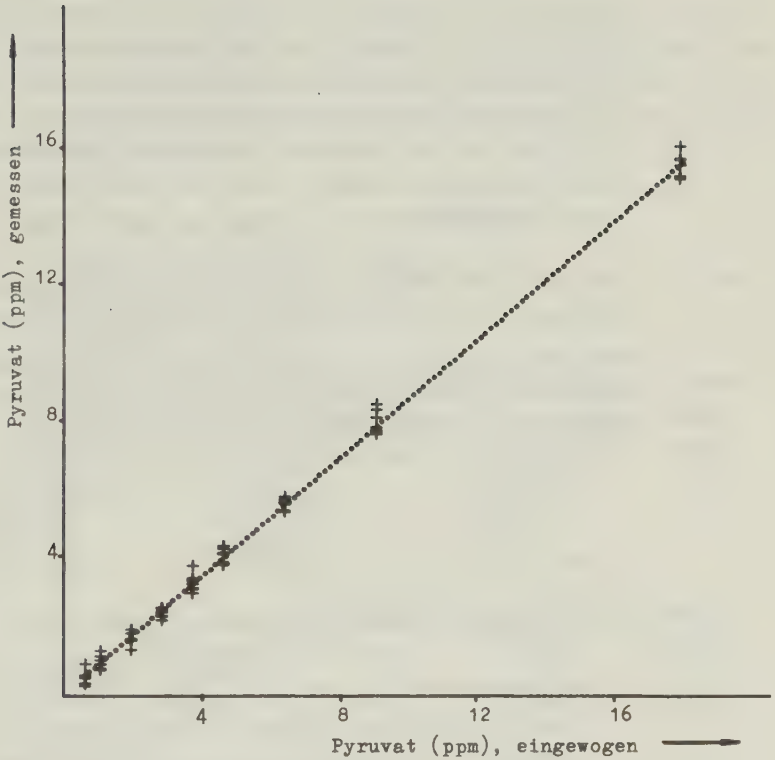
3.2.3.4. Eichkurve

Zur Kontrolle wurde eine Eichkurve für den in der Milch zu erwartenden Bereich der Pyruvatkonzentration ermittelt. Dazu wurden je 8 mal Konzentrationen von o.44, o.88, 1.76, 2.64, 3.52, 4.4o, 6.16, 8.8o und 17.6o ppm in Wasser hergestellt und anschließend photometriert. Das Ergebnis zeigt die Tabelle 5.

Tabelle 5

	Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5
Anzahl Proben	eingestellte Pyruvat-konzentrationen in ppm	gemessene Pyruvat-konzentrationen in ppm		Spalte 3 in % von Spalte 2	Spalte 2 in % von Spalte 1
		Mittel	s		
8	o.oo	o.oo	-	-	-
8	o.44	o.34	o.19	56	77
8	o.88	o.79	o.2o	25	9o
8	1.76	1.5o	o.17	11	85
8	2.64	2.27	o.12	5	86
8	3.52	3.18	o.25	8	9o
8	4.4o	4.oo	o.23	6	91
8	6.18	5.54	o.16	3	9o
8	8.8o	7.94	o.34	4	9o
8	17.6o	15.59	o.35	2	89

Aus der Spalte 5 der Tabelle 5 geht hervor, daß sämtliche gemessene Pyruvatkonzentrationen etwa 9o % der eingesetzten Pyruvatkonzentrationen erreichen. Die Ursache lag darin, daß bei der Herstellung der verschiedenen Pyruvatlösungen das



Eichkurve aus eingewogenem und gemessenem Pyruvat

Abbildung 7

eingewogene kristalline Na-Pyruvat äußerst schnell Wasserdampf aufnahm. Das war bereits beim Einwiegen mit der Präzisionswaage an der stetigen Gewichtszunahme zu erkennen. Die Einwaage bestand also offenbar zu etwa 1o % aus Wasser. Die Standardabweichungen (s) der gemessenen Pyruvatmittelwerte lagen absolut gesehen, unabhängig von der Pyruvatkonzentration, etwa in derselben Größenordnung. Dadurch nahm die Ungenauigkeit der Meßergebnisse um so mehr zu, je geringer die Pyruvatkonzentration war. Die Standardabweichung, in % des Mittel-

wertes ausgedrückt (Spalte 4 der Tab. 5), nahm von 2 % bei 15.59 ppm auf 56 % bei o.34 ppm zu. Pyruvatwerte unter o.5 ppm sind also mit einem recht großen Fehler behaftet. Werte dieser Größenordnung wurden aber kaum in der Milch ermittelt.
Das entscheidende Ergebnis der Eichkurve ist die Bestätigung der Linearität innerhalb des untersuchten Pyruvatbereiches. Wie die Abbildung 7 zeigt, liegen alle erhaltenen Punkte nahezu auf einer Geraden.

3.2.3.5. **Berechnung des methodischen Fehlers der Pyruvatbestimmung und Prüfung der homogenen Verteilung des Pyruvats in der Milch**

Einem Tankwagen wurden hintereinander 15 Rohmilchproben entnommen und im Doppelansatz auf den Pyruvatgehalt untersucht. Folgende Pyruvatwerte wurden festgestellt (in ppm):

2.19/2.53	1.89/2.09	1.97/2.5o
2.09/2.46	2.36/2.6o	2.16/2.52
2.1o/2.18	2.31/2.47	2.3o/2.o5
1.93/2.13	2.11/2.24	2.15/2.28
2.16/2.3o	2.3o/2.62	2.1o/2.42

Aus den 3o Bestimmungen ergab sich der Mittelwert:

$$\bar{x} = 2.25 \text{ ppm}$$

Die Standardabweichung betrug:

innerhalb der Zweiergruppen $s = \pm$ o.2oo ppm
zwischen den 15 Gruppen $s = \pm$ o.195 ppm

Eine nicht homogene Verteilung des Pyruvats in der Milch hätte für die Standardabweichung zwischen den 15 Milchproben einen zusätzlichen Fehler gegenüber dem methodischen Fehler innerhalb der 15 Doppelansätze zur Folge gehabt. Da beide Standardabweichungen gleich waren, waren die Pyruvatschwankungen methodisch bedingt, und die Verteilung des Pyruvats in der Milch konnte als homogen angesehen werden.

3.2.3.6. Einfluß des Einfrierens auf den Pyruvatgehalt

Die in der Literatur beschriebene Konservierung mit Formalin wurde nicht benutzt. Stattdessen wurden die Milchproben nach der bakteriologischen Untersuchung eingefroren und nach einigen Tagen zur Pyruvatbestimmung wieder aufgetaut. Um den Einfluß des Einfrierens bei - 25°C auf den Pyruvatgehalt bei Milchen unterschiedlich hoher Pyruvatkonzentration zu untersuchen, wurden drei verschiedene Milchen verwendet:

1. Vorzugsmilch am Tag der Gewinnung
2. Pasteurisierte Milch, 2 Tage alt
3. Rohmilch, 7 Tage alt

Jede Milch wurde im Doppelansatz vor dem Einfrieren, sowie im Doppelansatz nach dem Auftauen auf Pyruvat untersucht. Alle Milchen wurden für die Dauer eines Monats bei - 25°C eingefroren.

Tabelle 6 (alle Werte in ppm)

		Vorzugsmilch	Past. Milch	Rohmilch
Vor dem Einfr.	1.Ansatz	1.44	3.86	19.95
	2.Ansatz	1.35	3.78	19.54
	Mittelwert	1.4o	3.82	19.75
Nach dem Auftauen	1.Ansatz	1.48	3.9o	21.63
	2.Ansatz	1.35	3.82	2o.48
	Mittelwert	1.42	3.86	21.o6
Veränderungen in %		+ 1.4	+ 1.o	+ 6.6

Die Unterschiede sind besonders bei niedrigen Pyruvatwerten so geringfügig, daß auf eine weitere statistische Absicherung verzichtet und unterstellt wurde, daß durch das Gefrieren eine Beeinflussung der Pyruvatwerte nicht erfolgt.

3.3. Untersuchungsergebnisse

3.3.1. Kulturelle Untersuchungen der Trinkmilch in Berlin (West)

Sämtliche Keimzahlangaben beziehen sich auf 1 ml Milch.

3.3.1.1. Gesamtkeimgehalt

Im folgenden wurde als Gesamtkeimgehalt die jeweils höhere der in parallelen Ansätzen psychrotroph (4-5°C) und mesophil (3o°C) subkultivierten Keimzahlen angesehen.
Auch bei den Zeitreihen bei 4-5°C über mehrere Tage wurde jeweils bei 4-5°C und bei 3o°C subkultiviert. Die bei 3o°C gewachsenen Keime waren psychrotroph mesophil, da sie sich für die Dauer des Standversuches bei 4-5°C vermehrt haben. In den ersten Tagen der Zeitreihen überwogen meist noch die mesophil subkultivierten Keime, die ihr Wachstumsoptimum bei 2o-4o°C hatten. Mit zunehmender Dauer der Zeitreihen bei 4-5°C überwogen schließlich die in der Kälte subkultivierbaren Keime, also die psychrophilen.

Rohmilch aus der DDR

Die 4o zwischen August 1974 und März 1975 untersuchten Rohmilchproben enthielten im arithmetischen Mittel 1.22×10^6 und im geometrischen Mittel 8.0×10^5 Keime. Die Tabelle 7 zeigt die Klassenhäufigkeit in sechs verschiedenen Keimzahlbereichen.

Tabelle 7

Keimzahlbereich		Anzahl	
$< 10^6$	$< 1 \times 10^5$	3	21
	$< 1 \times 10^6$	18	
$> 10^6$	$1-2 \times 10^6$	12	19
	$2-3 \times 10^6$	3	
	$3-4 \times 10^6$	3	
	$4-5 \times 10^6$	1	

Über jahreszeitlich bedingte Unterschiede im Keimgehalt der Rohmilch gibt die Abbildung 8 einen Hinweis.

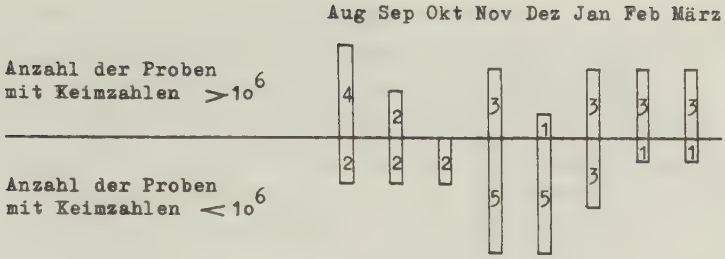


Abbildung 8

Vorzugsmilch aus Berlin (West)

Die Gesamtkeimzahl von 1o untersuchten Vorzugsmilchen variierte zwischen $1.93 \times 1o^4$ und $1.79 \times 1o^3$.

Pasteurisierte Milch aus der Bundesrepublik

14 Milchproben wurden zwischen April 1974 und April 1975 untersucht. Die Klassenhäufigkeit in verschiedenen Keimzahlbereichen zeigt die Tabelle 8.

Tabelle 8

Keimzahlbereich	Anzahl Proben
$<1 \times 1o^5$	6
$1-2 \times 1o^5$	6
$>2 \times 1o^5$	2

Der maximale Keimgehalt betrug $1.7 \times 1o^6$, der minimale $2.5 \times 1o^4$.

3.3.1.2. Verhältnis der psychrotroph (4-5°C) zu den mesophil (3o°C) subkultivierten Keimen

Rohmilch aus der DDR

Alle Gesamtkeimzahlen der 4o Proben wurden wieder den sechs Keimzahlbereichen zugeordnet. Die Tabelle 9 gibt das für jeden Keimzahlbereich durchschnittliche Verhältnis an, in dem die bei 4-5°C zu den bei 3o°C subkultivierten Keime stehen.

Tabelle 9

Gesamtkeimzahl-bereich	Anzahl Proben	Verhältnis 4-5°C / 3o°C subkultivierter Keime
$<1 \times 10^5_6$	3	o.35
$<1 \times 10^6_6$	18	o.52
$1-2 \times 10^6_6$	12	o.55
$2-3 \times 10^6_6$	3	o.94
$3-4 \times 10^6_6$	3	o.91
$4-5 \times 10^6$	1	1.11

Der durchschnittliche Anteil psychrotropher Keime am Gesamtkeimgehalt aller 4o Rohmilchproben ergab 59.2 %. Vier Rohmilchproben wiesen bereits am Tag der Probeentnahme eine überwiegend psychrophile Keimflora auf, es ließen sich bei 4-5°C mehr Keime als bei 3o°C subkultivieren.
Standversuche mit 23 der 4o Rohmilchproben über mehrere Tage bei 4-5°C bestätigten die Zunahme des Anteils bei 4-5°C subkultivierbarer Keime mit steigendem Gesamtkeimgehalt.

Tabelle 1o (Standversuch, 4-5°C)

Aufbewahrungszeit in Tagen	Anzahl Proben	Verhältnis 4-5°C / 3o°C subkultivierter Keime (Durchschnitt)
o	4o	o.59
1	6	o.62
2	13	o.68
3	14	o.99
4	4	1.o9
5	5	1.81
7	4	1.21

Vom 4.Tag an überwog eine psychrophile Keimflora. Ihr relativer Rückgang nach 5 Tagen Aufbewahrungszeit ist mit der auch bei Kühlschranktemperatur eingetretenen Säuerung der Milch zu erklären.

Vorzugsmilch aus Berlin (West)

5 der entsprechend untersuchten Proben hatten alle einen Anteil der bei 4-5°C subkultivierten Keime von unter 1o %. Dieser Anteil war viel geringer als der der Rohmilchen aus der DDR, entsprechend ihrer wesentlich geringeren Gesamtkeimzahl.

Pasteurisierte Milch aus der Bundesrepublik

5 der 14 Milchen wiesen eine überwiegend psychrophile Keimflora auf. Mit steigendem Gesamtkeimgehalt der 14 Proben wuchs der Anteil der Psychrotrophen. Bei den 6 Milchen mit Gesamtkeimzahlen unter $1o^5$ betrug das Verhältnis psychrotroph mesophil subkultivierbarer Keime im Durchschnitt o.37, bei den 8 Milchen mit mehr als $1o^5$ Keimen betrug es 1.27.

3.3.1.3. Thermophile Keime (bei 43°C bebrütet)

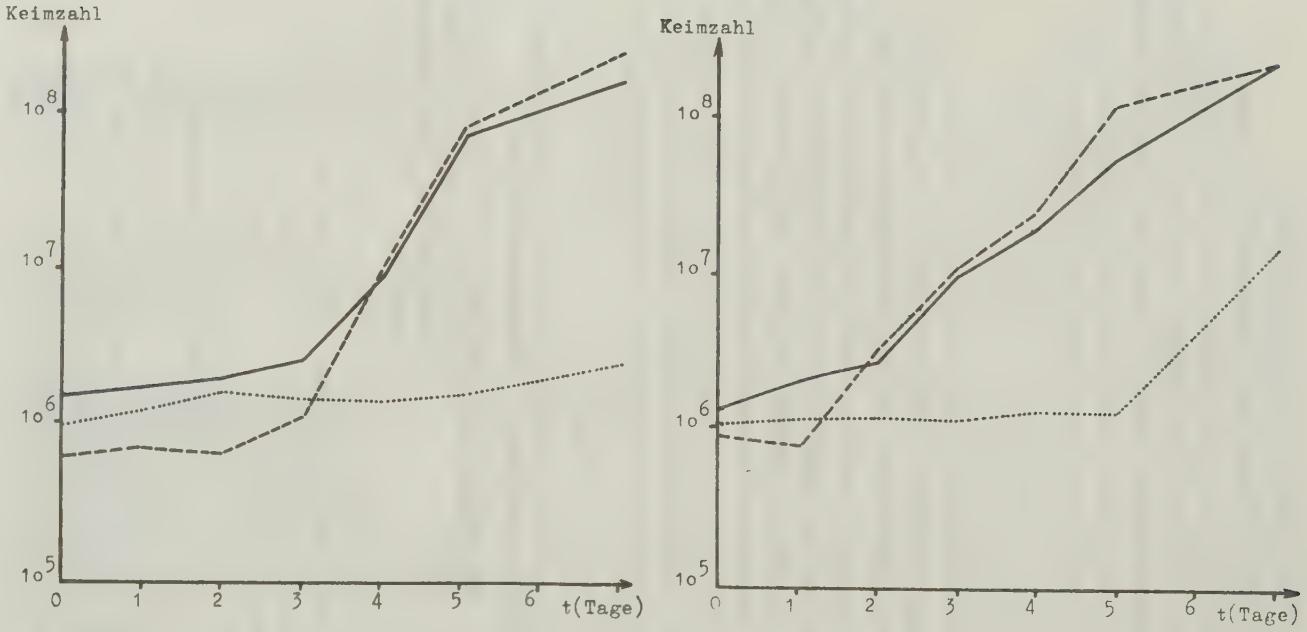
Rohmilch aus der DDR

12 Proben wiesen einen schwankenden Anteil Thermophiler am Gesamtkeimgehalt von 1o bis 95 % auf, ohne daß - wie bei den Psychrotrophen - ein Zusammenhang zur Gesamtkeimzahl festzustellen war. Auch ergab sich beim Vergleich der Milchproben kein Zusammenhang zwischen dem Anteil psychrotropher und dem Anteil thermophiler Keime - etwa in dem Sinne, daß mit steigendem Anteil psychrotropher der Anteil thermophiler Keime abnimmt. Die Standversuche zweier Milchproben bei 4-5°C für die Dauer einer Woche zeigten dagegen diesen Zusammenhang.

Tabelle 11

Vergleich der Entwicklung thermophil und psychrotroph subkultivierter Keime im Standversuch bei 4-5°C

	Tage	Gesamtkeimzahl	Verhältnis thermophil subk. Keime/Gesamtkeimzahl	Verhältnis psychrotroph subk./mesophil subk. Keime
1. Standversuch	o	$1.43 \times 1o^6$	o.71	o.42
	1	$1.62 \times 1o^6$	o.7o	o.42
	2	$1.77 \times 1o^6$	o.81	o.38
	3	$2.16 \times 1o^6$	o.58	o.46
	4	$9.36 \times 1o^7$	o.13	1.14
	5	$7.6o \times 1o^8$	o.o2	1.15
	7	$1.98 \times 1o^8$	o.o1	1.57
2. Standversuch	o	$1.35 \times 1o^6$	o.74	o.7o
	1	$1.95 \times 1o^6$	o.58	o.43
	2	$3.4o \times 1o^7$	o.33	1.44
	3	$1.14 \times 1o^7$	o.o9	1.25
	4	$2.45 \times 1o^7$	o.o5	1.15
	5	$9.9o \times 1o^7$	o.o1	1.87
	7	$1.59 \times 1o^8$	o.o7	1.o4



Zwei Standversuche bei 4-5°C über eine Woche. Vergleich der Entwicklung der psychrotroph (----), der mesophil (——) und der bei 43°C (·····) subkultivierten Keime.

Abbildung 9

Im Gegensatz zu den psychrotrophen Keimen wurde die Vermehrungsfähigkeit der thermophilen Keime bei Kühllagerung sichtlich eingeschränkt, wie auch die Abbildung 9 zeigt. Die absolute Anzahl der thermophilen Keime blieb bei beiden Proben die ganze Woche über mit etwa $1o^6$ Keimen konstant, bis auf einen Zuwachs um eine Zehnerpotenz beim 2. Standversuch. Gleichzeitig wurde die Milch derselben Proben einen Tag bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Während hier die Gesamtkeimzahl innerhalb von 24 Stunden um knapp das Tausendfache anstieg (auf nahezu $1o^9$ Keime), nahm der Anteil der Thermophilen immerhin um das Hundertfache zu.[x)]

Pasteurisierte Milch aus der Bundesrepublik

Der Gehalt an thermophilen Keimen von 7 entsprechend untersuchten Proben betrug im Mittel 35 % des Gesamtkeimgehalts. Der durchschnittliche Anteil der Psychrotrophen dieser 7 Milchen betrug 91 %. Obwohl sich unmittelbar nach der Pasteurisierung nur Thermophile in der Milch befanden, hatte sich nach dem Transport, bei Anlieferung in Berlin, eine überwiegend psychrotrophe Flora aufgebaut. Damit bestätigte sich das Ergebnis der beiden Standversuche der Rohmilchproben, daß bei niederen Temperaturen ein Selektionsdruck zugunsten der Psychrotrophen und zuungunsten der Thermophilen ausgeübt wird.

3.3.1.4. Oxydasepositive Keime

Rohmilch aus der DDR

Im Durchschnitt von 27 Proben betrug der Anteil oxydasepositiver Keime am Gesamtkeimgehalt 4.9 %. Er schwankte zwischen o.2 % und 21.9 %. Aus der Tabelle 12 ergibt sich bei höherem Gesamtkeimgehalt auch ein höherer Anteil oxydasepositiver Keime. Auch der Anteil der oxydasepositiven Keime an den Psychrotrophen nahm zu. Das läßt den Schluß zu, daß die oxydasepositiven Keime eine aktivere Keimvermehrung aufweisen als andere Psychrotrophe.

x) Definitionsgemäß dürfte es sich nicht um echte "Thermophile", sondern um thermotrophe Mesophile gehandelt haben. Thermophile im engeren Sinne wachsen bei Zimmertemperatur nicht. S. auch S. 45 u.a.

Tabelle 12

Gesamtkeimzahl	Anzahl Proben	Oxydasepositive in % (Mittel) am Gesamtkeimgehalt	Psychrotrophe in % (Mittel) am Ges.keimg.	Oxydasepositive in % (Mittel) der Psychrotrophen
$< 10^6$	15	2.7	45.1	6.5
$> 10^6$	12	7.8	68.6	11.6

3.3.1.5. Enterokokken

Diese fäkalen Streptokokken geben als sog. Schmutzkeime einen Überblick über die Hygiene und die Sorgfalt der Behandlung der Milch.

Rohmilch aus der DDR

28 Proben wurden auf den Gehalt an Enterokokken untersucht. Die meisten Enterokokken enthielten zwei Proben mit 9.6 und 7.4 % des Gesamtkeimgehalts. Alle anderen Proben enthielten unter 2 %, davon 24 unter 1 % und 18 sogar weniger als o.5 % Enterokokken. Teilt man die 28 Proben vier Keimzahlbereichen zu, dann ergeben sich folgende durchschnittliche Enterokokkenanteile am Gesamtkeimgehalt:

Tabelle 13

Gesamtkeimzahlbereich	Anzahl Proben	Anteil der Enterokokken am Gesamtkeimgehalt in %
$< 10^5$	3	3.7
$< 10^6$	14	1.1
1-2 x 10^6	4	o.4
$> 2 \times 10^6$	7	o.2

Ein Standversuch einiger dieser Milchproben über mehrere Tage bei 4-5°C bestätigte die Abnahme des Enterokokkenanteils mit zunehmendem Gesamtkeimgehalt.

Tabelle 14 (Standversuch, 4-5°C)

Anzahl Proben	Dauer des Standversuchs in Tagen	Enterokokken in % des Gesamtkeimgehalts	
		vor Standversuch	nach Standversuch
4	1	o.5	o.3
6	2	o.3	o.2
4	3	o.5	o.3
2	4	o.2	$<$o.1
2	7	o.2	$<$o.o1

Bei den Milchen mit relativ hohen Enterokokkenanteilen von 9.6 bzw. 7.4 % fiel auf, daß sie mit 87 % bzw. 53 % auch recht hohe Anteile psychrotropher Keime aufwiesen. Es existierte also ein Zusammenhang zwischen übermäßig hohen Anteilen an Enterokokken und Psychrotrophen.

Pasteurisierte Milch aus der Bundesrepublik

Bei 11 untersuchten Proben ergab sich ein Enterokokkenanteil von deutlich unter 1 % im Durchschnitt. Er schwankte zwischen o.o1 % und 1.33 %. Der bei der Rohmilch festgestellte Zusammenhang - zunehmender Gesamtkeimgehalt, abnehmender Enterokokkenanteil - ließ sich hier nicht nachweisen. Die Ursache liegt darin, daß mit der Pasteurisierung die Gesamtkeimzahl lediglich um ein bis zwei Zehnerpotenzen vermindert wird, während sämtliche Enterokokken abgetötet werden, so daß der Zusammenhang zwischen beiden verloren geht.

3.3.1.6. Coliforme Keime, Enterobacteriaceae

Rohmilch aus der DDR

13 der 4o Rohmilchproben wurden auf Endo-S-Agar und 9 davon zusätzlich auf dem Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (VL), auf den Gehalt an coliformen Keimen und parallel dazu auf dem Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar (VG) auf Enterobacteriaceae untersucht. Die 13 Proben nach zunehmendem Gesamtkeimgehalt geordnet, ergaben folgende Anteile:

Tabelle 15

Gesamtkeimgehalt	Anteil Coliformer bzw. Enterobacteriaceae in % des Gesamtkeimgehalts		
	Endo-S	VL	VG
3.1×10^5	o.35	o.13	o.13
4.1×10^5	o.3o	o.o5	o.o7
$5.o \times 10^5$	o.6o	-	o.o4
5.1×10^5	3.53	-	o.82
6.5×10^5	1.54	1.54	1.54
6.8×10^5	1.18	-	o.1o
7.6×10^5	o.92	-	1.32
9.5×10^5	6o.53	13.68	11.58
$1.o \times 10^6$	5.oo	1.oo	6.oo
1.1×10^6	2.65	o.88	o.88
1.4×10^6	4.o7	2.81	o.79
1.4×10^6	o.o7	o.o9	o.o8
3.7×10^6	31.62	15.oo	23.65

Ein Zusammenhang zwischen dem Anteil Coliformer und dem Gesamtkeimgehalt ließ sich nicht erkennen. Im Standversuch bei 4-5°C nahm mit ansteigendem Gesamtkeimgehalt bis zu $1o^7$ Keimen der Anteil coliformer Keime jedoch zu.

Tabelle 16 (Standversuch, 4-5°C)

Gesamtkeimgehalt	Aufbewahrungszeit in Tagen	Anteil Coliformer (Endo-S-Agar) am Gesamtkeimgehalt in %	
		1. Standversuch	2. Standversuch
$<1o^7$	0	o.o7	4.o7
	1	o.61	o.67
	2	4.62	2.62
	3	2o.37	4.74
$>1o^8$	7	4.o4	o.63

Beim 2. Standversuch nahm der Coliformenanteil erst nach einer anfänglichen Abnahme zu. Am 7. Tag waren diese bei 4-5°C gewachsenen Keime durch die eingetretene Säuerung der Milch in ihrem Anteil am Gesamtkeimgehalt vermindert.
Alle 13 Rohmilchproben wiesen mindestens $1o^3$ Coliforme auf, 5 Proben $1o^4$ bis $1o^5$, eine über $1o^5$ und eine über $1o^6$ Coliforme - alles Ergebnisse von Untersuchungen, die direkt nach der Probeentnahme in der Meierei-Zentrale durchgeführt wurden.

Pasteurisierte Milch aus der Bundesrepublik

9 Untersuchungen parallel auf Endo-S-, VL- und VG-Agar führten zu folgenden Ergebnissen:

Tabelle 17

Gesamtkeimgehalt	Anteil Coliformer bzw. Enterobacteriaceae in % des Gesamtkeimgehalts		
	Endo-S	VL	VG
$9.2 \times 1o^4_5$	11.41	o.87	o.87
$1.o \times 1o^5_5$	3o.39	96.27	62.35
$1.1 \times 1o^5_5$	28.18	4o.91	33.27
$1.2 \times 1o^5_5$	o.42	o.17	o.o8
$1.5 \times 1o^5_5$	3.94		o.66
$1.7 \times 1o^5_5$	2.42	6.o6	o.61
$1.9 \times 1o^5_5$	21.51	1o.oo	4o.32
$4.3 \times 1o^6$	12.79	15.12	11.63
$1.7 \times 1o^6$	21.76	19.12	4.o9

Der durchschnittliche Anteil der coliformen Keime am Gesamtkeimgehalt war bei den Milchen aus der Bundesrepublik viel größer als bei den Rohmilchen aus der DDR. Absolut waren die Coliformenzahlen beider Milchen ähnlich.

3.3.1.7. Mikrokokken, eigelbpositive Staphylokokken

Rohmilch aus der DDR

Alle auf Kranep-Agar durchgeführten 11 Untersuchungen zeigten Mikrokokken, 8 auch eigelbpositive Staphylokokken.

Tabelle 18

Gesamtkeimgehalt	Mikrokokken	eigelb+ Staph.	Anteil am Gesamtkeimgehalt (%)	
			Mikrokokken	eigelb+ Staph.
3.1×10^5	2.1×10^4	2×10^2	6.7o	o.o6
4.1×10^5	1.9×10^4	1×10^2	4.64	o.o2
$5.o \times 10^5$	6.2×10^4	3×10^2	12.4o	o.o6
5.1×10^5	1.9×10^3	3×10^1	3.63	o.o6
6.5×10^5	4.5×10^4	6×10^2	o.7o	o.o1
6.8×10^5	6.2×10^3	9×10^2	9.12	o.13
7.6×10^5	5.4×10^4	1×10^2	o.71	o.o1
9.5×10^6	9.9×10^4	$< 10^2$	1o.38	< o.o1
1.4×10^6	1.9×10^4	3×10^2	1.42	o.o2
1.4×10^6	1.1×10^3	$< 10^2$	o.79	< o.oo7
3.7×10	2.1×10^3	$< 10^2$	o.o6	< o.oo3

Der Anteil der Mikrokokken betrug im Durchschnitt 4.59 % des Gesamtkeimgehalts, der der eigelbpositiven Staphylokokken o.o3 %. In der Tendenz ließ sich bei diesen Keimen mit steigendem Gesamtkeimgehalt der Milchen eine relative Abnahme feststellen - ähnlich wie bei den Enterokokken. Standversuche zeigten dies deutlich:

Tabelle 19 (Standversuch, 4-5°C)

Aufbewahrungszeit in Tagen	Anteil der Mikrokokken am Gesamtkeimgeh.(%	
	1. Standversuch	2. Standversuch
0	o.79	1.42
2	o.23	o.54
7	o.oo3	o.23

Pasteurisierte Milch aus der Bundesrepublik

In Relation zum Gesamtkeimgehalt betrug der Mikrokokkenanteil von 7 untersuchten Proben im Durchschnitt o.25 % und maximal

o.75 %. Absolut gesehen, wurden max. 1.4×10^3 Mikrokokken nachgewiesen. Eigelbpositive Staphylokokken wurden nirgends nachgewiesen.

3.3.1.8. Pasteurisierung

Gesamtkeimgehalt, Pasteurisierungsrate

12 der 4o Rohmilchproben aus der DDR sowie 12 der 14 bereits in der Bundesrepublik pasteurisierten Milchen wurden vor und nach der Pasteurisierung in der Meierei-Zentrale auf den Gesamtkeimgehalt untersucht. Zwei Milchen wurden ultrahocherhitzt.

Tabelle 2o

Prozentsatz der die Pasteurisierung überlebenden Keime; Milchen aus der Bundesrepublik und der DDR nach steigendem Gesamtkeimgehalt geordnet

Herkunftsort		Gesamtkeimgehalt vor der Pasteuris.	%-satz der die Past. überstehenden Keime	
BRD	DDR			
x		2.52×10^4	24.37	
	x	4.08×10^4	1.02	
x		6.07×10^4	1o.76	
x		7.36×10^4	46.47	
x		8.00×10^4	31.oo	
x		$9.2o \times 10^4$	55.11	
x		1.02×10^5	7.44	
x		$1.1o \times 10^5$	7.85	
x		1.19×10^5	13.o3	
x		1.52×10^5	5.44	
x		1.65×10^5	5.o1	x)
x		1.86×10^5	o.oo	
	x	$3.1o \times 10^5$	11.94	
	x	$4.o5 \times 10^5$	8.4o	
	x	$6.5o \times 10^5$	3.6o	
	x	$7.6o \times 10^5$	4.37	
	x	$9.5o \times 10^5$	o.32	
	x	$1.oo \times 10^6$	1.32	
	x	$1.1o \times 10^6$	3.35	
	x	1.13×10^6	8.32	
	x	1.32×10^6	5.89	
	x	1.44×10^6	4.81	
x		$1.7o \times 10^6$	o.oo	x)
	x	$3.7o \times 10^6$	o.38	

x) Ultrahocherhitzung

Mit zunehmendem Gesamtkeimgehalt ergab sich eine größere Pasteurisierungsrate. Werden die Milchen vier Keimklassen zugeordnet, dann ergeben sich folgende Pasteurisierungsraten:

Tabelle 21

Anzahl Proben	Keimklasse	Die Pasteurisierung überlebende Keime (%)	Pasteurisierungsrate
6	$1.0 \times 10^4 - 1.0 \times 10^5$	28.12	71.88
5	$1.0 \times 10^5 - 2.5 \times 10^5$	7.75	92.25
5	$2.5 \times 10^5 - 1.0 \times 10^6$	5.73	94.27
6	$> 1.0 \times 10^6$	4.01	95.99

Im Durchschnitt betrug die Pasteurisierungsrate für alle 22 Milchen 88.17 %. Alle Milchen enthielten nach der Pasteurisierung weniger als 10^5 Keime, 18 enthielten weniger als 5×10^4 Keime (82 %). Der absolute Gesamtkeimgehalt nach der Pasteurisierung betrug im Durchschnitt für die Milchen aus der Bundesrepublik 1.7×10^4 und für die Milchen aus der DDR 3.6×10^4.

Psychrotrophe Keime

waren in zwei Milchproben nach der Pasteurisierung nachzuweisen, einmal mit 5 und einmal mit 42 Keimen pro ml.

Thermophile Keime

Die Pasteurisierungsrate der Thermophilen, ermittelt aus 13 Milchproben, betrug im Mittel 96.91 %. Sie schwankte zwischen 99.94 und 90.91 %. Sie war größer als die des Keimgehalts insgesamt. Daraus ergibt sich, daß es sich bei diesen Organismen offensichtlich nicht um eigentliche Thermophile, sondern nur um thermotroph-mesophile Keime handelte.

Oxydasepositive, Enterokokken, Coliforme

wurden nach der Pasteurisierung in keiner Milch nachgewiesen.

Mikrokokken

erwiesen sich als recht hitzestabil. Von 6 Rohmilchen und 7 Milchen aus der Bundesrepublik enthielten nach der Pasteurisierung noch 7 Milchen Mikrokokken, und zwar zwischen 20 und 530 pro ml. Die Pasteurisierungsrate für Mikrokokken betrug im Durchschnitt aller 13 Proben 95.34 %, im Minimum 47.5 %. Eigelbpositive Staphylokokken waren nirgends nachzuweisen.

3.3.2. Pyruvat in der Milch

3.3.2.1. Pyruvatgehalt, mesophiler und psychrotropher Keimgehalt in Rohmilch

4o Rohmilchproben wurden am Tag der Probeentnahme sowie an einem oder mehreren darauffolgenden Tagen auf den Pyruvatgehalt und auf den Gehalt an mesophil und psychrotroph subkultivierbaren Keimen untersucht. Bei wiederholten Untersuchungen im Standversuch wurden die Proben bei 4-5°C aufbewahrt. Die bei mesophiler und psychrotropher Kultivierung jeweils höhere Keimzahl entsprach dem Gesamtkeimgehalt. Die Ergebnisse sind der Tabelle 22 zu entnehmen. Der Rubrik "Aufbewahrungszeit" ist die Dauer zu entnehmen, die bis zur wiederholten Untersuchung einer Probe, verstrichen war. In der Rubrik "Verhältnis psychrotroph/ mesophil subkultivierter Keime" (Verh. ps./mes. subk. Keime) ergab sich bei Werten $< 1.o$ der Gesamtkeimgehalt aus der mesophil subkultivierten, und bei Werten $> 1.o$ aus der psychrotroph subkultivierten Keimzahl.

Tabelle 22

Pyruvatgehalt, Gesamtkeimgehalt und Verhältnis der psychrotroph zu den mesophil subkultivierten Keimen von 4o Rohmilchproben, sowie von einmaligen bis sechsmaligen nachfolgenden Untersuchungen von 23 dieser Proben im Standversuch bei 4-5°C

Aufbewahrungszeit (Tage)	Pyruvatgehalt (ppm)	mesophil subkultiv. Keimgehalt	psychrotroph subkultiv. Keimgehalt	Verh. ps./mes. subk. Keime
0	3.78	1.43×10^6	6.00×10^5	o.42
1	3.9o	1.63×10^6	$6.8o \times 10^5$	o.42
2	4.o2	1.77×10^6	6.67×10^5	o.38
3	4.27	2.16×10^6	9.91×10^6	o.46
4	6.4o	8.18×10^7	9.36×10^7	1.14
5	9.44	$6.6o \times 10^8$	$7.6o \times 10^8$	1.15
7	13.71	1.26×10^9	1.98×10^9	1.57
0	2.87	1.35×10^6	9.41×10^5	o.7o
1	3.7o	1.95×10^6	8.45×10^5	o.43
2	3.98	2.36×10^6	$3.4o \times 10^6$	1.44
3	5.62	$9.o9 \times 10^7$	1.14×10^7	1.25
4	7.14	2.14×10^7	2.45×10^7	1.15
5	9.2o	$5.3o \times 10^8$	$9.9o \times 10^8$	1.87
7	11.33	1.53×10^9	1.59×10^9	1.o4

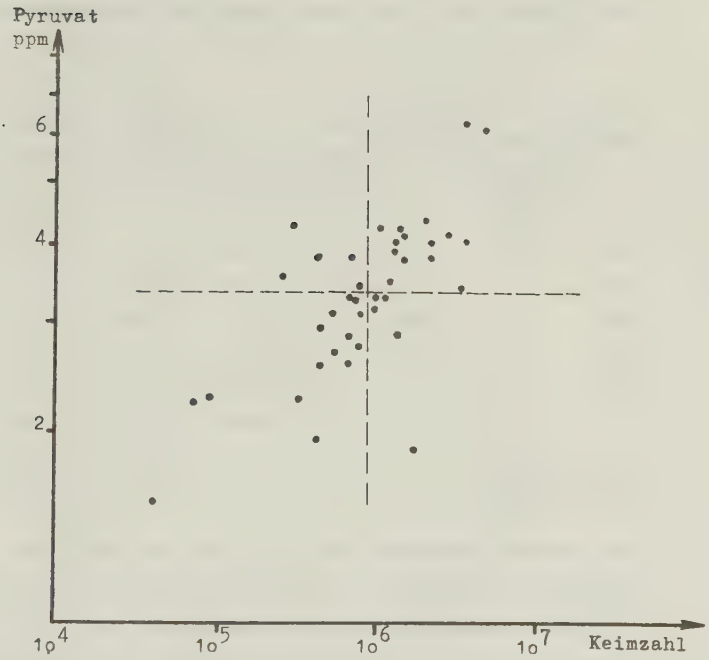
Tabelle 22 (Forts.)

Aufbewahrungszeit (Tage)	Pyruvatgehalt (ppm)	mesophil subkultiv. Keimgehalt	psychrotroph subkultiv. Keimgehalt	Verh. ps./mes. subk. Keime
0	3.82	$4.05 \times 10^{5}_{5}$	$5.00 \times 10^{3}_{4}$	0.01
2	4.55	$7.73 \times 10^{6}_{6}$	$7.28 \times 10^{6}_{6}$	0.09
4	9.69	$7.64 \times 10^{8}_{8}$	$8.64 \times 10^{8}_{8}$	1.13
7	27.50	2.18×10	2.68×10	1.23
0	3.26	$7.10 \times 10^{5}_{5}$	$6.17 \times 10^{4}_{4}$	0.09
2	3.57	$9.20 \times 10^{6}_{6}$	$8.78 \times 10^{6}_{6}$	0.10
4	7.02	$7.88 \times 10^{8}_{8}$	$7.41 \times 10^{8}_{8}$	0.94
7	19.54	2.64×10	2.61×10	0.99
0	2.71	$5.10 \times 10^{5}_{6}$	$3.30 \times 10^{5}_{5}$	0.65
2	3.53	$1.02 \times 10^{8}_{8}$	$8.84 \times 10^{8}_{8}$	0.87
9	41.11	9.89×10	2.87×10	0.29
0	2.26	$6.50 \times 10^{4}_{5}$	$1.80 \times 10^{4}_{4}$	0.28
3	3.84	$2.75 \times 10^{6}_{6}$	$7.50 \times 10^{6}_{6}$	0.27
5	8.21	4.15×10	4.06×10	0.98
0	2.30	$8.73 \times 10^{4}_{5}$	$2.20 \times 10^{4}_{5}$	0.25
3	3.98	$5.00 \times 10^{6}_{6}$	$1.50 \times 10^{6}_{6}$	0.30
5	7.39	4.89×10	3.98×10	0.81
0	4.31	$1.99 \times 10^{6}_{6}$	$1.48 \times 10^{6}_{6}$	0.74
1	4.70	$4.63 \times 10^{7}_{7}$	$2.29 \times 10^{6}_{6}$	0.50
2	6.16	1.23×10	7.35×10	0.60
0	2.75	$7.07 \times 10^{5}_{6}$	$4.50 \times 10^{5}_{5}$	0.64
1	3.53	$1.34 \times 10^{6}_{6}$	$8.95 \times 10^{6}_{6}$	0.67
2	5.09	4.87×10	2.63×10	0.54
0	6.20	$3.47 \times 10^{6}_{7}$	$3.12 \times 10^{6}_{7}$	0.90
3	16.19	$3.66 \times 10^{8}_{8}$	$9.82 \times 10^{8}_{8}$	2.68
5	32.84	1.35×10	5.70×10	4.22
0	4.26	$2.94 \times 10^{5}_{5}$	$4.32 \times 10^{4}_{5}$	0.15
2	5.62	$9.52 \times 10^{6}_{6}$	$3.23 \times 10^{6}_{6}$	0.34
3	8.54	3.64×10	4.20×10	1.15
0	3.41	$2.58 \times 10^{6}_{7}$	$3.04 \times 10^{6}_{7}$	1.18
2	5.99	$1.12 \times 10^{7}_{7}$	$2.13 \times 10^{7}_{7}$	1.90
3	8.99	3.41×10	6.98×10	2.05
0	2.94	$4.24 \times 10^{5}_{5}$	$2.63 \times 10^{4}_{4}$	0.06
2	3.57	$9.80 \times 10^{6}_{6}$	$8.80 \times 10^{4}_{5}$	0.09
3	5.42	5.50×10	6.97×10	0.13
0	6.06	$4.27 \times 10^{6}_{7}$	$4.73 \times 10^{6}_{7}$	1.11
1	8.15	$1.00 \times 10^{7}_{7}$	$1.57 \times 10^{7}_{7}$	1.57
2	10.67	3.10×10	4.63×10	1.49
0	3.53	$2.46 \times 10^{5}_{5}$	$4.10 \times 10^{4}_{4}$	0.17
1	3.74	$3.42 \times 10^{5}_{5}$	$4.50 \times 10^{4}_{4}$	0.13
2	4.39	6.43×10	8.75×10^{4}	0.14

Tabelle 22 (Forts.)

Aufbewahrungszeit (Tage)	Pyruvatgehalt (ppm)	mesophil subkultiv. Keimgehalt	psychrotroph subkultiv. Keimgehalt	Verh. ps./mes. subk. Keime
0	3.04	7.60×10^6	4.20×10^5	0.55
3	3.78	1.78×10^6	1.55×10^6	0.87
0	2.87	6.50×10^6	3.50×10^5	0.54
3	3.37	1.44×10^6	1.40×10^6	0.97
0	3.49	1.16×10^6	7.34×10^5	0.63
2	4.80	2.45×10^6	2.22×10^6	0.91
0	3.78	6.80×10^6	2.94×10^5	0.43
3	5.50	2.78×10^6	2.70×10^6	0.97
0	3.08	5.00×10^6	4.39×10^5	0.88
3	4.64	2.65×10^6	2.65×10^6	1.00
0	4.27	1.42×10^6	2.59×10^5	0.18
3	6.90	6.10×10^6	5.08×10^6	0.83
0	3.90	1.32×10^6	9.27×10^5	0.70
3	5.34	4.35×10^6	3.98×10^6	0.92
0	3.33	6.50×10^8	4.30×10^5	0.66
9	43.83	1.14×10^8	1.18×10^8	1.04
0	2.59	4.05×10^5	2.88×10^5	0.71
0	2.30	3.10×10^5	2.06×10^5	0.67
0	3.45	7.20×10^5	6.61×10^5	0.92
0	3.16	9.50×10^5	8.25×10^5	0.87
0	2.59	6.50×10^5	4.40×10^5	0.68
0	1.85	1.60×10^6	1.75×10^6	1.09
0	4.02	3.70×10^6	2.40×10^6	0.65
0	3.37	1.00×10^6	4.64×10^5	0.46
0	3.37	1.13×10^6	5.73×10^5	0.51
0	4.02	2.16×10^6	1.88×10^6	0.87
0	4.15	2.82×10^6	2.84×10^6	1.01
0	3.76	2.20×10^6	2.08×10^6	0.95
0	1.93	4.00×10^5	2.70×10^5	0.68
0	4.02	1.32×10^6	2.65×10^5	0.20
0	4.19	1.44×10^6	2.23×10^5	0.16
0	1.53	4.08×10^4	2.15×10^4	0.53
0	4.28	1.10×10^6	9.10×10^5	0.83

In der Abbildung 1o sind im logarithmischen Maßstab die Pyruvatwerte der Erstuntersuchungen der 4o Rohmilchproben in Abhängigkeit vom zugehörigen Gesamtkeimgehalt dargestellt. Die Prüfung mit dem Vier-Felder-Test ergab für steigende Gesamtkeimzahl einen Anstieg des Pyruvatgehalts in der Milch.



Zusammenhang zwischen Gesamtkeimzahl und zugehörigem Pyruvatwert der 4o Rohmilchproben am Tag der Probeentnahme.

Abbildung 1o

Aus den Pyruvatwerten und den Gesamtkeimzahlen der Rohmilchproben wurden für die verschiedenen Aufbewahrungszeiten bei 4-5°C die geometrischen Mittelwerte gebildet und in Beziehung zueinander gesetzt.

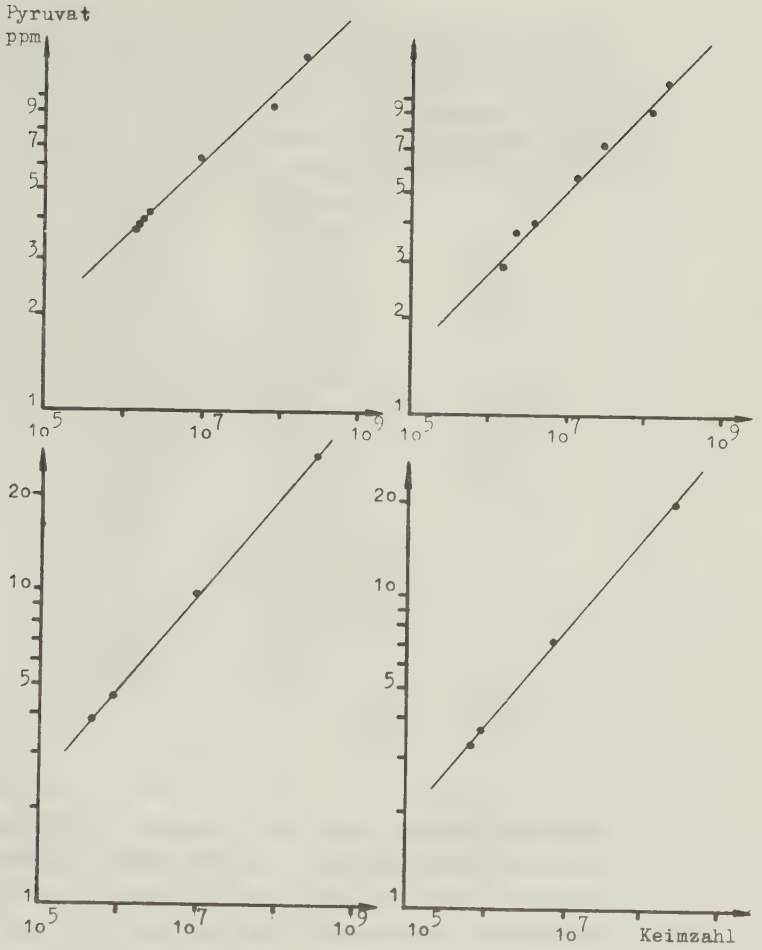
Tabelle 23

Geometrische Mittelwerte des Pyruvatgehalts und der Gesamtkeimzahl sowie obere und untere Grenze der Standardabweichungen (s) der Rohmilchen im Standversuch bei 4-5°C

Anzahl Proben	Aufbewahrungszeit (Tage)	Pyruvatgehalt			Gesamtkeimgehalt		
		Mittelwert (geom.)	s		Mittelwert (geom.)	s	
			untere Grenze	obere Grenze		untere Grenze	obere Grenze
4o	0	3.28	2.46	4.39	8.0×10^5	2.8×10^5	2.3×10^6
6	1	4.4o	3.21	6.o5	2.2×10^6	6.0×10^5	7.8×10^6
13	2	4.83	3.56	6.55	2.7×10^6	6.7×10^5	1.1×10^7
14	3	5.6o	3.66	8.56	4.0×10^6	8.0×10^5	2.0×10^7
4	4	7.47	6.24	8.94	1.1×10^7	6.6×10^6	1.9×10^7
5	5	11.16	6.o6	2o.56	3.9×10^7	4.7×10^7	3.2×10^8
6	7 u. mehr	23.o6	13.15	4o.45	2.5×10^8	1.2×10^8	5.3×10^8

3.3.2.2. Verlaufsuntersuchungen bei 4-5°C über mehrere Tage

23 der 4o Rohmilchproben wurden mehrfach, zwei- bis siebenmal, in Standversuchen bis zu einer Woche bei 4-5°C auf den Gesamtkeimgehalt und den Pyruvatgehalt untersucht. Die Abbildung 11 zeigt vier Zeitreihen mit zweimal sieben und zweimal vier Keimzahl- und Pyruvatmessungen. Für die Punkte, die sich aus den Keimzahl- und Pyruvatwerten ergaben, wurden Regressionsgeraden errechnet, die alle Korrelationskoeffizienten von $r > o.99$ aufwiesen. Es wurde deshalb eine lineare Beziehung zwischen Gesamtkeimzahl- und Pyruvatzuwachs innerhalb eines Standversuches angenommen. Die Tabelle 24 gibt für die 23 Zeitreihen-Geraden Steigung und y-Achsenabschnitt (y = ln Pyruvat), sowie die Korrelationskoeffizienten an.



Vier Standversuche bei 4-5°C über je eine Woche.
Berechnung von Regressionsgeraden.

Abbildung 11

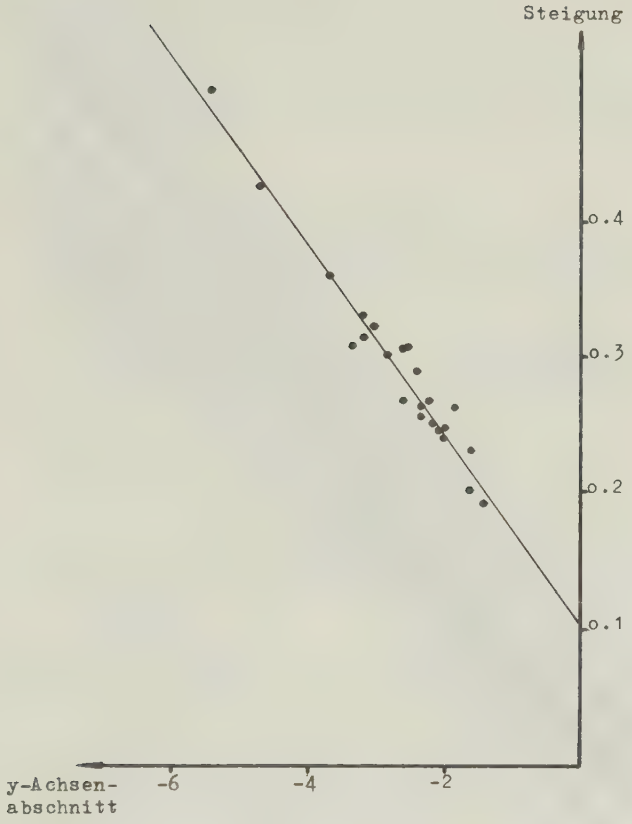
Tabelle 24

Steigung, y-Achsenabschnitt und Korrelationskoeffizient der 23 Zeitreihen-Geraden

Untersuchungen pro Zeitreihe (Anzahl)	Steigung	y-Achsenabschnitt	r
7	o.249	- 2.193	o.996o4
7	o.267	- 2.627	o.99346
4	o.3o6	- 2.614	o.99994
4	o.3o2	- 2.873	o.99976
3	o.358	- 3.7o4	o.99999
3	o.3o6	- 2.546	o.99738
3	o.289	- 2.439	o.99913
3	o.198	- 1.441	o.96966
3	o.314	- 3.197	o.9965o
3	o.322	- 3.o48	o.99594
3	o.262	- 1.866	o.99876
3	o.3o7	- 3.371	o.99896
3	o.239	- 2.o23	o.99994
3	o.248	- 2.o1o	o.99999
3	o.231	- 1.6o7	o.99635
2	o.256	- 2.355	-
2	o.2o2	- 1.648	-
2	o.426	- 4.7o3	-
2	o.266	- 2.247	-
2	o.246	- 2.o99	-
2	o.329	- 3.212	-
2	o.264	- 2.353	-
2	o.496	- 5.429	-

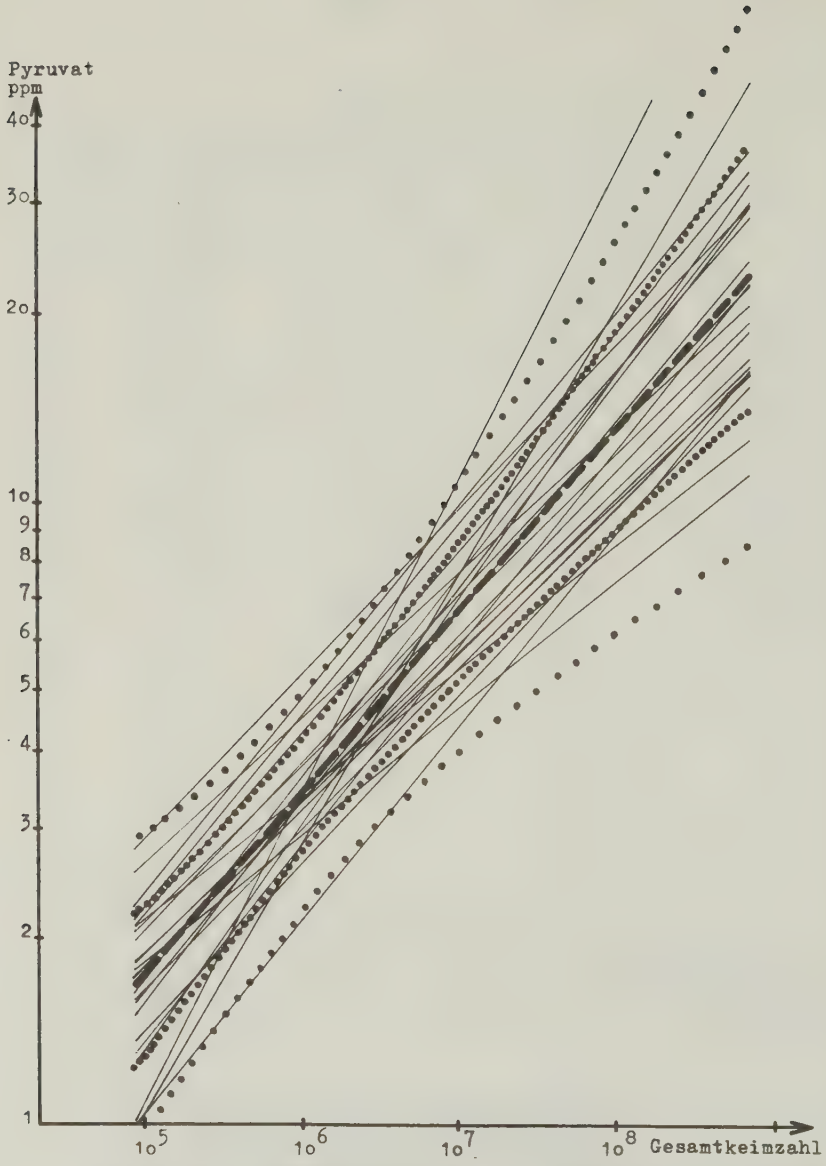
In der Abbildung 12 sind von den 23 Geraden, die sich aus den Zeitreihen ergeben haben, die Steigungen in Abhängigkeit der y-Achsenabschnitte dargestellt. Steigungen und y-Achsenabschnitte korrelieren dabei mit r = - o.976. Je größer also die Steigung der Geraden, desto weiter liegt der zugehörige y-Achsenabschnitt im negativen Bereich.

In der Abbildung 13 wurden sämtliche 23 Geraden dargestellt. Weiterhin wurde die mittlere Regressionsgerade errechnet sowie die einfache und doppelte Standardabweichung der einzelnen 23 Geraden um diese mittlere Gerade. (Für diese Darstellung wurde der Einfachheit halber vom "Regressionsmodell I" ausgegangen, wenngleich wegen der bei beiden Variablen - Pyruvat und Keimzahl - auftretenden Fehler das "Modell II" angemessen wäre).



Abhängigkeit der Steigungen von den y-Achsenabschnitten der 23 Geraden, die aus den 23 Standversuchen der Rohmilchproben errechnet wurden.

Abbildung 12



Geraden der 23 Standversuche bei 4-5°C, mittlere Regressionsgerade, einfache und doppelte Standardabweichung. Die Variation wurde auf Schwankungen des Pyruvats zurückgeführt.

Abbildung 13

Da sowohl zur Berechnung der einzelnen Regressionsgeraden als auch der mittleren Regressionsgeraden die gesamte Variation auf unterschiedliche Schwankungen des Pyruvats zurückgeführt wurde, können jetzt für die Rohmilchen, die bei 4-5°C gelagert wurden, für beliebige Keimzahlen (innerhalb des untersuchten Keimzahlbereiches) zugehörige mittlere Pyruvatwerte sowie deren einfache bzw. doppelte Standardabweichungen angegeben werden.[x)]

Tabelle 25

Gegenüberstellung von einigen Keimzahlen und den zugehörigen Pyruvatmittelwerten sowie deren einfache (s) und doppelte (2s) Standardabweichungen (der Abbildung 13 entnommen)

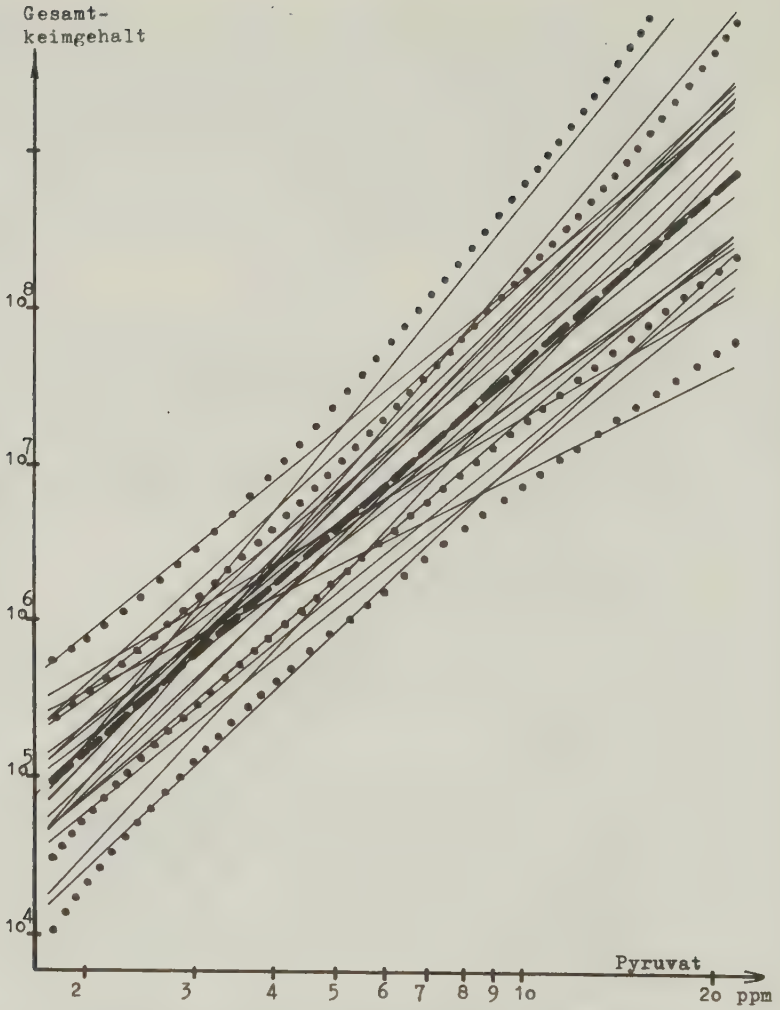
Gesamtkeimzahl	Pyruvat (ppm)					
	Mittel	untere Grenze	s	obere Grenze	untere Grenze	2s obere Grenze
1×10^5	1.7	1.3		2.2	1.0	2.9
1×10^6	3.5	2.8		4.2	2.2	5.0
1×10^7	6.8	5.2		8.8	4.0	11.0
1×10^8	12.5	8.9		18.5	6.0	25.0

Der Tabelle ist zu entnehmen, daß eine Verzehnfachung des Keimgehalts etwa mit einer Verdopplung des Pyruvatgehalts einhergeht.

Der Pyruvatgehalt wurde bisher in Abhängigkeit vom Keimgehalt betrachtet. Genauso berechtigt ist die andere Darstellung, in der die gesamte Variation dem Keimgehalt angelastet wird. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 14. Jetzt kann von einem beliebigen Pyruvatgehalt (innerhalb des untersuchten Pyruvatbereiches) auf die entsprechende Keimzahl im Mittel sowie in den Grenzen der einfachen und doppelten Standardabweichung geschlossen werden. In der Tabelle 26 sind für einige Pyruvatwerte die zugehörigen Gesamtkeimzahlen der bei 4-5°C gelagerten Rohmilchen und deren Standardabweichungen angegeben.

---

x) Die Daten wurden mit einem Computer WANG 72o C statistisch ausgewertet und mit einem Plotter WANG 7o2 ausgedruckt.
Für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und die Durchführung von Berechnungen danke ich Herrn Prof. Dr. H. Weiß und Herrn Hans Berner.



Geraden der 23 Standversuche bei 4-5°C, mittlere Regressionsgerade, einfache und doppelte Standardabweichung. Die Variation wurde auf Schwankungen des Gesamtkeimgehalts zurückgeführt.

Abbildung 14

Tabelle 26

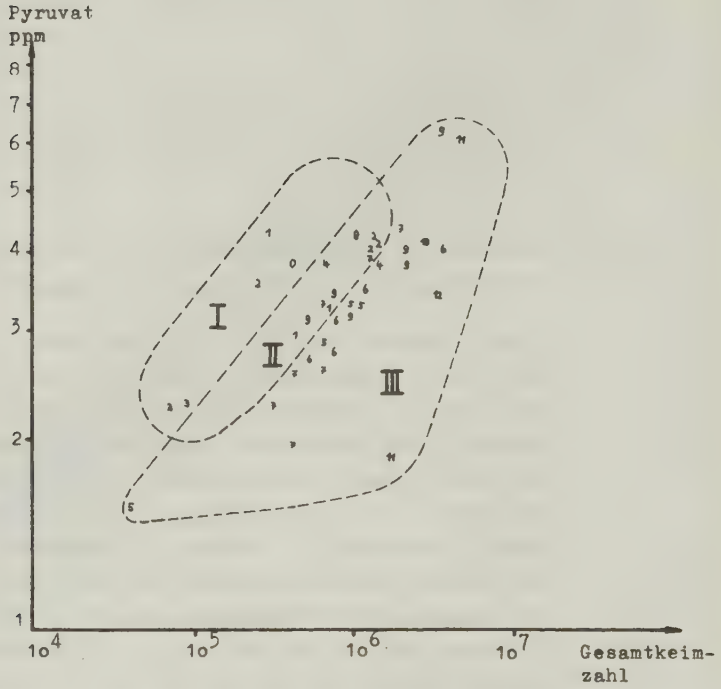
Gegenüberstellung von einigen Pyruvatwerten und den zugehörigen mittleren Keimzahlen sowie deren einfache (s) und doppelte (2s) Standardabweichungen

Pyruvat (ppm)	Gesamtkeimgehalt				
	Mittel (geo-metr.)	s		2s	
		untere Grenze	obere Grenze	untere Grenze	obere Grenze
2	2×10^5	7×10^4	5×10^5	2×10^4	8×10^5
3	6×10^6	3×10^5	1×10^6	1×10^5	3×10^6
4	2×10^6	8×10^5	4×10^6	5×10^5	9×10^6
6	6×10^7	3×10^6	2×10^7	2×10^6	6×10^8
8	2×10^7	8×10^7	6×10^8	4×10^6	2×10^8
10	5×10^7	2×10^7	2×10^8	8×10^6	7×10^8

3.3.2.3. Abhängigkeit des Pyruvatgehalts einer Milch vom Verhältnis der psychrotrophen zu den mesophilen Keimen

In der Abbildung 15 sind die Gesamtkeimzahl- und Pyruvatergebnisse der 40 Rohmilchproben wiederum dargestellt, jeder Punkt ist jedoch als Zahl angegeben, die das Verhältnis der psychrotrophen zu den mesophilen Keimen charakterisiert. Dabei sind die in der Tabelle 22 angegebenen Verhältnisse auf o.1, o.2 usw. bis 1.2 auf- bzw. abgerundet und der Übersichtlichkeit halber als Ziffern 1, 2 usw. bis 12 dargestellt.
Alle Punkte, die aus den Keim- und Pyruvatwerten von Milchen mit weniger als 35 % Psychrotrophen (Verhältnis $\leq$ o.35) resultieren, sind in der Abbildung 15 zu dem Bereich I zusammengefaßt, alle Milchen mit mehr als 35 % Psychrotrophen bilden den Bereich III. Der Bereich II, der aus der Überschneidung der Bereiche I und III resultiert, umfaßt Milchen mit einem Psychrotrophen-Anteil von 10 bis 90 % (entspricht Ziffer 1 bis 9). Vergleicht man die Milchen der Bereiche I und III miteinander, dann ergeben sich bei geringerem Anteil Psychrotropher (Bereich I) für gleiche Keimzahlen höhere Pyruvatwerte als bei größerem Anteil Psychrotropher (Bereich III), bzw. ein bestimmter Pyruvatgehalt resultiert im Bereich I aus einer viel geringeren Keimzahl als im Bereich III.

5 Milchen im Bereich I hatten im Durchschnitt ein Verhältnis von Psychrotrophen zu Mesophilen von o.17, 24 Milchen im Bereich III von o.74 und 11 Milchen im Bereich II von o.46.



Einfluß des Verhältnisses psychrotrophe/mesophile Keime auf die Höhe des Pyruvatspiegels, der aus einer bestimmten Keimzahl resultiert. Die Ziffern 1, 2 usw. bis 12 charakterisieren Verhältnisse von o.1, o.2 usw. bis 1.2 (psychrotrophe/mesophilen Keimen). I: Bereich mit weniger als 35 % Psychrotrophe, III: Bereich mit mehr als 35 % Psychrotrophe, II: Überschneidung der Bereiche I und III.

Abbildung 15

3.3.2.4. Einfluß der Temperatur auf die Entwicklung von Gesamtkeim- und Pyruvatgehalt im Standversuch

8 Vorzugsmilchen (Rohmilch) aus Berlin (west) wurden je einmal bei 21°C und je zweimal bei 4-5°C bebrütet. Das Ergebnis zeigt die Tabelle 27. Der Anstieg (ln Pyruvat/ln Gesamtkeimzahl) betrug im Mittel aller 21°C-Standversuche m = o.1o5 und im Mittel aller 4-5°C-Standversuche m = o.45o (zum Vergleich: Anstieg der mittleren Regressionsgeraden der Rohmilchen aus der DDR: m = o.29o). Weiterhin wurde festgestellt, daß bei den 6-1o Stunden aufbewahrten Milchen bei 21°C der Anteil der psychrotrophen Keime sehr viel stärker zunahm als bei den bei 4-5°C inkubierten Milchen. Bei den 21°C-Standversuchen änderte sich das Verhältnis psychrotrophe/mesophile Keime innerhalb von 6 bzw. 1o Stunden von o.o7 auf o.73, bei den Standversuchen bei 4-5°C über 24 bis 48 Stunden von o.o3 auf o.29 im Durchschnitt. Innerhalb der 4-5°C-Standversuche konnte folgendermaßen differenziert werden: Die Milchen mit den steilsten Anstiegen ($m > o.5oo$) wiesen nahezu unverändert geringe Anteile an Psychrotrophen auf. Bei den geringen Anstiegen ($m \leq o.222$) nahmen die psychrotrophen Keime sehr viel stärker zu. Keim- und Pyruvatgehalt dieser Milchen entwickelten sich ähnlich wie in den 21°C-Standversuchen. Der Pyruvatausgangswert bei den steilen Anstiegen von über o.5oo lag durchweg unter 2 ppm.

Insgesamt war bei diesem Versuch festzustellen, daß die Vorzugsmilchen um 1 bis 2 Zehnerpotenzen geringere Keimzahlen aufwiesen als die Rohmilchen aus der DDR, jedoch war ihr Pyruvatgehalt nur wenig geringer.

Tabelle 27

Abhängigkeit des Pyruvatanstiegs bei der Keimvermehrung von der Temperatur (Anstieg = ln Pyruvat/ln Keimzahl)
Zum Vergleich: Entwicklung des Anteils psychrotroph subkultivierter Keime am Gesamtkeimgehalt

Standversuch bei 4-5°C

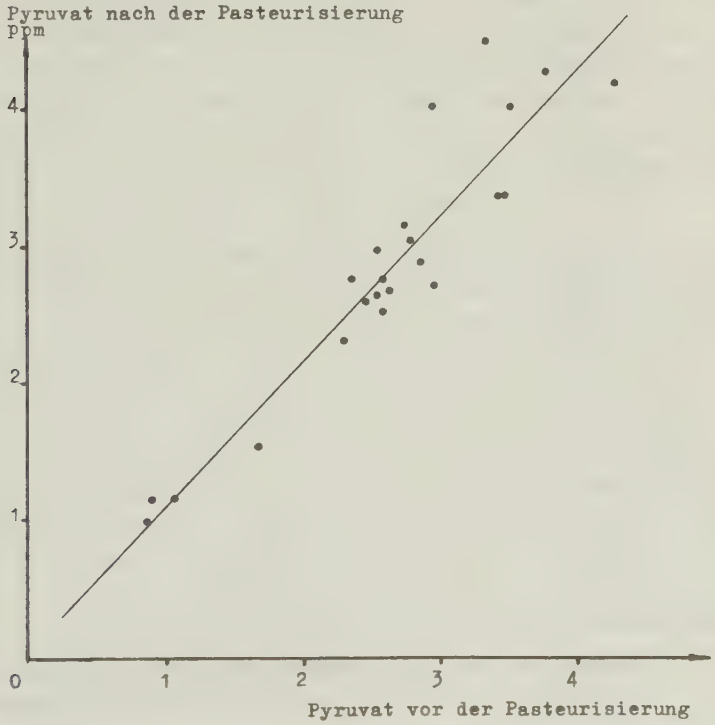
Beginn des Standversuchs			Ende des Standversuchs			Anstieg (ln Pyruvat/ ln Keimzahl	Dauer in Stunden
Pyruvat (ppm)	Gesamtkeimzahl	Verhältnis psychrotr./ mesoph. Keimen	Pyruvat (ppm)	Gesamtkeimzahl	Verhältnis psychrotr./ mesoph. Keimen		
1.74	1.73×10^4	o.13	2.13	$2.1o \times 10^4$	o.14	1.o71	24
1.85	1.63×10^4	o.o1	2.o1	$2.o5 \times 10^4$	o.o1	o.384	24
1.89	$1.3o \times 10^4$	o.o1	2.o9	1.55×10^4	o.o1	o.592	24
1.89	$1.o8 \times 10^4$	o.o1	2.13	1.28×10^4	o.o1	o.743	24
1.91	$1.o3 \times 10^4$	o.o2	2.3o	$1.3o \times 10^4$	o.16	o.794	24
2.3o	2.58×10^4	o.o2	2.34	2.75×10^4	o.o7	o.286	24
1.74	1.73×10^4	o.13	2.67	1.19×10^5	o.97	o.222	48
1.85	1.63×10^4	o.o1	2.18	$2.5o \times 10^4$	o.o1	o.386	48
1.85	2.48×10^3	o.o7	2.3o	4.16×10^3	o.35	o.416	48
1.89	$1.o8 \times 10^4$	o.o1	2.5o	$1.7o \times 10^4$	o.o2	o.628	48
1.89	$1.3o \times 10^4$	o.o1	2.46	$2.oo \times 10^4$	o.o1	o.624	48
1.91	$1.o3 \times 10^4$	o.o2	2.96	$4.3o \times 10^4$	o.57	o.3o6	48
2.18	2.18×10^3	o.1o	2.65	4.77×10^3	o.38	o.248	48
2.3o	2.58×10^4	o.o2	3.o6	7.77×10^4	1.31	o.256	48

Standversuche bei 21°C

2.o1	$2.o5 \times 10^4$	o.o1	2.46	$6.8o \times 10^4$	o.44	o.166	6
2.o9	1.55×10^4	o.o1	2.42	$5.oo \times 10^4$	o.5o	o.126	6
2.13	1.28×10^4	o.o1	2.38	$5.8o \times 10^4$	o.63	o.o73	6
2.13	$2.1o \times 10^4$	o.14	3.37	$8{,}52 \times 10^5$	o.87	o.123	6
2.3o	$1.3o \times 10^4$	o.16	2.96	$7.3o \times 10^5$	o.76	o.o62	6
2.34	2.75×10^4	o.o7	3.74	8.64×10^5	o.68	o.136	6
1.85	2.48×10^3	o.o7	2.91	2.35×10^5	o.89	o.1oo	1o
2.18	2.18×10^3	o.1o	2.81	$2.2o \times 10^5$	1.o8	o.o55	1o

3.3.2.5. Pyruvat bei der Pasteurisierung der Milch

12 Rohmilchen aus der DDR und 12 bereits in der Bundesrepublik pasteurisierte Milchen wurden vor und nach der Pasteurisierung in der Meierei-Zentrale Berlin auf den Pyruvatgehalt untersucht. Aus der Abbildung 16 ist ersichtlich, daß der Pyruvatgehalt der meisten Milchen kaum durch die Pasteurisierung verändert wurde. Die etwas größeren Pyruvatveränderungen können ihre Ursache darin haben, daß nicht immer genau dieselbe Milchmenge vor und nach der Pasteurisierung zur Untersuchung kam.

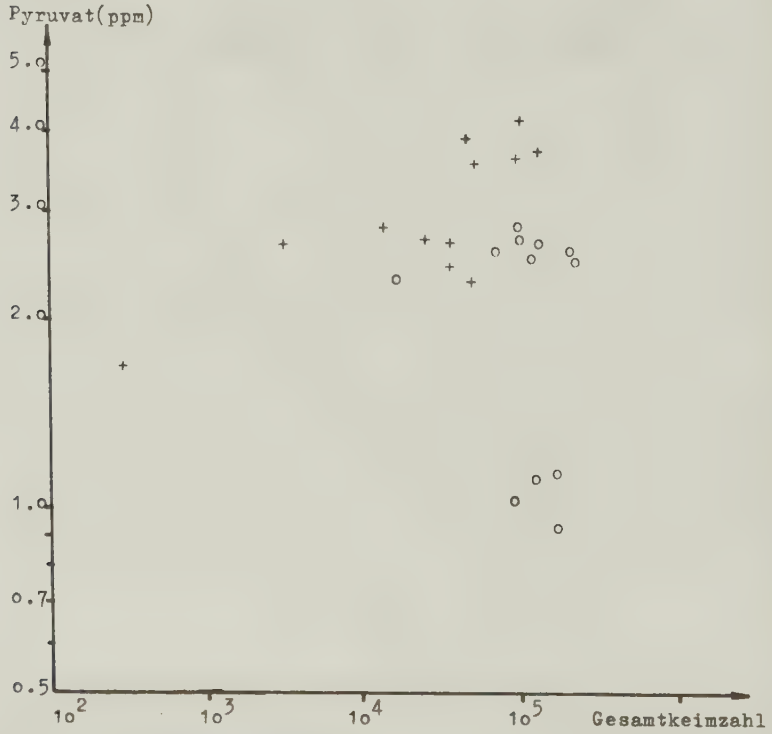


Pyruvatgehalt vor und nach der Pasteurisierung

Abbildung 16

3.3.2.6. Beziehung zwischen Pyruvat- und Gesamtkeimgehalt in pasteurisierter Milch

Die Abbildung 17 zeigt die Pyruvat- und Gesamtkeimgehalte der 12 Rohmilchen nach der Pasteurisierung sowie der 12 Milchen, die bereits in der Bundesrepublik pasteurisiert wurden.
Die unsystematische Punktwolke läßt keinen Zusammenhang zwischen Pyruvat- und Keimgehalt erkennen. Dieser Zusammenhang geht mit der Pasteurisierung verloren, da nur der Keimgehalt stark vermindert wird, während der Pyruvatgehalt unbeeinflußt bleibt.



Pyruvat- und Keimgehalt pasteurisierter Milchen
+ Milch aus der DDR
o Milch aus der Bundesrepublik

Abbildung 17

4. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

4.1. Ergebnis der kulturellen Analyse der Milch

Die Gesamtkeimzahlen der Anlieferungsmilch aus der Bundesrepublik entsprachen größenordnungsmäßig denen, die STEPHAN (1969) für die Berliner Anlieferungsmilch aus der Bundesrepublik fest-stellte. Sie lagen in ihrer Mehrheit unter $1o^6$ Keimen/ml. Bei den Rohmilchen aus der DDR dagegen lagen ca. 5o % aller Gesamtkeimzahlen über $1o^6$/ml.
Die Berliner Vorzugsmilch hatte mit Abstand den geringsten Gesamtkeimgehalt aufzuweisen mit durchweg unter $2 \times 1o^4$ Keimen/ml. Die Vorzugsmilchen, obwohl nicht pasteurisiert, wiesen eine sehr gute Qualität auf, eine Folge des kurzen Zeitabstandes zwischen Produktion und Konsum und Ergebnis der intensiven milchhygienischen Überwachung.

Sowohl bei der Anlieferungsmilch aus der Bundesrepublik als auch bei der aus der DDR nahm mit steigendem Gesamtkeimgehalt der Anteil der Psychrotrophen zu, was bei der Milch aus der Bundesrepublik schneller erfolgte, und überstieg schließlich den mesophilen Keimgehalt. Das Ergebnis STEPHANs, daß bei Anstieg des Gesamtkeimgehalts über $1o^6$ der Psychrotrophen-Anteil wieder auf 16.6 % abfällt, bestätigte sich nicht. Auffällig war die Tatsache, daß vier frisch angelieferte Rohmilchen aus der DDR bei einem Gesamtkeimgehalt von über einer Millionen pro ml mehr psychrotrophe als mesophile Keime enthielten, wozu im Standversuch bei 4-5°C immer eine Entwicklung von wenigstens zwei Tagen nötig war. Hierfür könnten verschiedene Ursachen verantwortlich sein, die im einzelnen nicht aufgeklärt werden konnten.

Von Bedeutung sind die oxydasepositiven Keime. Diese Eiweißspalter spielten bei Kühlschranktemperatur die aktivste Rolle und traten innerhalb der psychrotrophen Flora besonders in den Vordergrund.
Enterokokken nahmen mit kaum mehr als 1-2 % der Gesamtkeimzahl eine untergeordnete Bedeutung ein, zumal ihr Anteil mit zuneh-

mender Gesamtkeimzahl stetig abnahm. Ein hoher Enterokokkenanteil, zweimal mit 9.6 und 7.4 % gemessen, scheint auf eine reichliche Kontamination der Milch nicht nur mit Enterokokken hinzuweisen, wie die in diesen beiden Proben ermittelten überdurchschnittlichen Psychrotrophen-Anteile zeigten.

Während STEPHAN bei 94 % der untersuchten Milchen aus der Bundesrepublik auf dem Violet-Red-Bile-Agar einen Coliformen-Anteil von unter $1o^2$/ml feststellte, lag er bei diesen Untersuchungen mit dem Endo-S-Agar bis auf eine Ausnahme durchweg über $1o^3$ Coliformen/ml, bei der Hälfte sogar über $1o^4$/ml.

Mikrokokken enthielten alle 11 entsprechend untersuchten Rohmilchproben sowie 6 von 7 Milchen aus der Bundesrepublik. 8 der 11 Rohmilchproben enthielten ebenso eigelbpositive Staphylokokken. STEPHAN hatte lediglich in 57 % der Milchen aus der Bundesrepublik Mikrokokken nachweisen können. In der Milch aus der Bundesrepublik wurden weder von STEPHAN noch hier eigelbpositive Staphylokokken gefunden. Die Rohmilchuntersuchungen bestätigten die in der Literatur bereits beschriebene Beobachtung (ABO-ELNAGA und KANDLER, 1965; CLARK und NELSON, 1961), daß Mikrokokken und eigelbpositive Staphylokokken mit zunehmender Keimvermehrung unterdrückt werden.

Die nach Berlin angelieferte Milch wird vor der Abgabe pasteurisiert, nicht nur die Rohmilch aus der DDR, sondern auch die schon einmal erhitzte Milch aus der Bundesrepublik. Wie auch bei STEPHAN zeigte sich, daß mit zunehmendem Gesamtkeimgehalt die Pasteurisierungsrate zunimmt. 1966 lag sie für niedrige Keimzahlen bis $1o^5$/ml noch bei 59.4 %, in den eigenen Versuchen wurde sie mit 71.9 % für den betreffenden Keimzahlbereich ermittelt. Für Milchen mit mehr als $1o^6$ Keimen pro ml ergab sich eine Pasteurisierungsrate von 96 %.

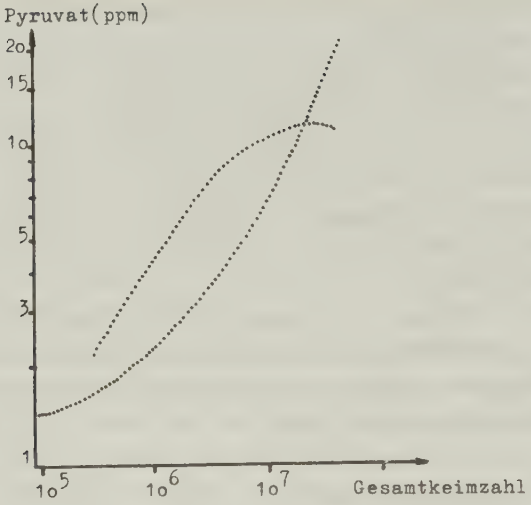
Weder bei STEPHAN noch hier ließen sich nach der Pasteurisierung Psychrotrophe, Pseudomonaden bzw. Oxydasepositive, Coliforme, Enterokokken oder eigelbpositive Staphylokokken nachweisen - bis auf eine Ausnahme bei den Psychrotrophen.

Den Psychrotrophen kommt besondere Bedeutung zu, da sie sich bei Kühlung der Milch schneller vermehren als die übrige Flora. In der pasteurisierten Milch treten sie ausschließlich als Folge einer Reinfektion auf und machen nach kurzer Zeit bereits einen

beträchtlichen Anteil des Gesamtkeimgehalts aus. Aufgrund ihrer eiweiß- und fettspaltenden Eigenschaften sind sie in besonderem Maße für den Verderb der Milch verantwortlich. BUSSE forderte deshalb bereits 1969 eine zielbewußte Bekämpfung der psychrophilen Reinfektionskeime, um die Haltbarkeit der pasteurisierten Milch wesentlich zu verbessern.
Mikrokokken fanden sich nach der Pasteurisierung noch in mehr als der Hälfte der Milchproben, bei STEPHAN waren es nur 9 % der Proben.
Nach der Pasteurisierung enthielt die Milch nicht mehr Keime, als STEPHAN 1966 ermittelte. Damit entspricht auch heute die Berliner Trinkmilch den bakteriologischen und hygienischen Anforderungen.

4.2. Pyruvatanalytik

Als Produkt des bakteriellen Katabolismus erschien Pyruvat als brauchbarer Parameter, um eine Information über die Keimbelastung der Milch zu vermitteln. Die Beziehung zwischen Pyruvatgehalt und Milchqualität ist bisher nur in der Tendenz nachzuweisen, wie die Schwierigkeit zeigt, exakte Pyruvatgrenzwerte für die Milch festzulegen. Gleiche Pyruvatwerte können zu Keimzahlen gehören, die bis um das Dreißigfache variieren. TOLLE et al. (1972) und WERNERY (1972) erhielten als Zusammenhang zwischen Keim- und Pyruvatgehalt von 17o9 Sammelmilchen im logarithmischen Maßstab eine Kurve, die zunehmend steiler ansteigt (s. Abb. 3, S. 15). Trägt man aber die Ergebnisse ihrer Standversuche (Tab. 2, S. 16) in das gleiche Diagramm ein, so ergibt sich eine Kurve mit abnehmender Steigung, die dazu im Bereich von $1o^6$ bis $1o^7$ Keimen/ml doppelt so hohe Pyruvatwerte aufweist, siehe Abbildung 18.
Diese Ergebnisse wurden mit der Pyruvatbestimmung nach der kontinuierlichen Durchflußanalyse im Auto-Analyzer-System erhalten. Ein Vergleich dieser Methode mit der manuellen enzymatischen Pyruvatbestimmung von KOHLER (1974) ergab eine gute Übereinstimmung, so daß ein Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den in der Literatur beschriebenen wohl zulässig ist.



Beziehung zwischen Pyruvatgehalt und Gesamtkeimzahl in 17o9 Sammelmilchproben am Tag der Probeentnahme (Kurve mit zunehmender Steigung) und in 32o Standversuchen bei 9°C über bis zu vier Tage (Kurve mit abnehmender Steigung). Beide Kurven nach den Ergebnissen von TOLLE et al. (1972) und WERNERY (1972).

Abbildung 18

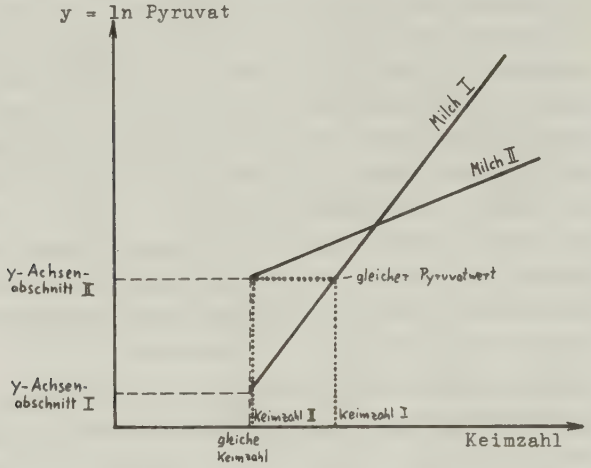
Bei den eigenen Untersuchungen von 4o Rohmilchproben ergab sich eine breite Streuung zwischen Pyruvat- und Gesamtkeimgehalt. Der Vier-Felder-Test ließ mit zunehmendem Keimgehalt einen ansteigenden Pyruvatgehalt erkennen. Ein Vergleich zwischen den Rohmilchen aus der DDR mit den Vorzugsmilchen aus Berlin (West) führte zu noch größeren Abweichungen. Gleiche Pyruvatgehalte ergaben sich für Keimzahlen, die bis um das Hundertfache variierten.

Eine äußerst enge Beziehung stellte sich jedoch zwischen Keim- und Pyruvatgehalt heraus, wenn diese innerhalb derselben Milchproben mehrere Tage lang wiederholt in Standversuchen bei 4-5°C geprüft wurden. Unter den Bedingungen der konstanten

Temperatur sowie Verhinderung jeder weiteren Kontamination ergab sich - nach logarithmischer Transformation - ein nahezu konstantes Verhältnis zwischen Pyruvat- und Gesamtkeimgehalt (im untersuchten Keimzahlbereich von 10^5 bis 10^8 Keimen/ml). Bemerkenswert war die Tatsache, daß die Schwankungen innerhalb der Steigungen der 23 Geraden, die aus jedem der 23 Standversuche berechnet wurden, nicht zufällig waren. Die Steigung war um so größer, je kleiner der y-Achsenabschnitt (y = ln Pyruvat) der Geraden war (s. Abb. 12, S. 53). Für die Standversuche bei 4-5°C war deshalb folgende Tendenz erkennbar: Je kleiner bei einem bestimmten Keimgehalt einer Rohmilch der Pyruvatgehalt war, um so größer war in der Folge der Pyruvatzuwachs im Verhältnis zur Keimzunahme.

TOLLE et al. (1972) haben angenommen, daß eine hohe Primärkontamination nicht ohne weiteres zu einem Anstieg des Pyruvat-Pools führe, solange keine Keimvermehrung eingesetzt hat. Andererseits würden wenige, aber bereits längere Zeit stoffwechselaktive Bakterien einen deutlichen Anstieg des Pools verursachen. Weiterhin wurde festgestellt (HEESCHEN et al., 1974), daß bei Milchen, denen Pyruvat zugesetzt wurde, der Pyruvatzuwachs gegenüber dem Erwartungswert vermindert war. Der vorhandene Pyruvatgehalt wirkt also hemmend auf die weitere Pyruvatbildung der Bakterien. Das geht auch daraus hervor, daß eine Verzehnfachung des Keimgehalts nur mit einer Verdoppelung des Pyruvatgehalts einhergeht (s. Tab 25, S. 55).
Ist nun eine Milch (I) stark kontaminiert, dann enthält sie, gemessen an der Keimzahl, anfangs nur wenig Pyruvat. Während der folgenden Keimvermehrung wird die Pyruvatausschleusung nur wenig gehemmt, es ergibt sich deshalb eine relativ starke Pyruvatzunahme. Damit würde sich eine Gerade mit steilem Anstieg und niedrigem y-Achsenabschnitt (ln Pyruvat) ergeben. Eine andere Milch (II), bei der nur eine geringe Primärkontamination erfolgte, wird beim Erreichen der Keimzahl der Milch I bereits einen wesentlich höheren Pyruvatgehalt aufweisen. In der Folge wirkt dieser Pyruvat-Pool einer weiteren Pyruvatbildung entgegen, so daß die weitere Keimvermehrung mit einem relativ geringen Pyruvatanstieg einhergeht. Es kommt zu einer

Geraden mit flachem Anstieg und großem y-Achsenabschnitt. Die Abbildung 19 veranschaulicht diesen Zusammenhang.



Abhängigkeit des Pyruvatanstiegs vom Basiswert und von der initialen Kontamination

Abbildung 19

Anhand der Abbildung 19 wird die Unzulänglichkeit einer einmaligen Pyruvatbestimmung zur Einschätzung der Keimbelastung der Milch deutlich. Dort, wo beide Milchen den gleichen Pyruvatgehalt aufweisen, müßten sie als gleich bewertet werden, obwohl die Milch II viel weniger Keime enthält, jedoch bald in Relation zum Pyruvatgehalt viel mehr als die Milch I enthalten wird.

Aus den Geraden, die jeder Standversuch lieferte, konnten eine mittlere Regressionsgerade und die Standardabweichung der einzelnen Geraden um diese errechnet werden. 14 der 23 Geraden lagen völlig innerhalb des Bereiches der einfachen Standardabweichung (61 %), 21 innerhalb der doppelten Standardabweichung (91 %). Aus der Abbildung 13 (S. 54) ist zu erkennen, daß die Standardabweichung des Pyruvatmittelwertes im unteren Keimzahlbereich größer ist, mit steigendem Keimgehalt kleiner und dann wiederum größer wird. Im mittleren Keimzahlbereich (etwa

von 5 x 10^5 bis 5 x 10^6 Keimen/ml) konzentrieren sich die Geraden, dort ist die Beziehung zwischen Gesamtkeim- und Pyruvatgehalt am engsten.

Milchen mit anderen Keimfloren und unter anderen Temperaturen gelagert, führen zu anderen Pyruvatwerten, wie die Ergebnisse von TOLLE und WERNERY, sowie die eigenen Untersuchungen der Vorzugsmilchen zeigten. Um eine Aussage über das Verhältnis Keimzahlentwicklung/Pyruvatanstieg für Milch allgemein treffen zu können, müßten auch andere Einflußgrößen, wie Primärkontamination, Keimart und Inkubationsbedingungen, bekannt sein.

Die Beeinflussung der Pyruvatbildung durch die Keimart geht deutlich aus der Beimpfung steriler Milchen mit Reinkulturen hervor, wie die Abbildung TOLLEs (s. Abb. 4, S.19) zeigt. Zwar bildeten die Keime, die sich am stärksten vermehrten, schließlich auch die größte Pyruvatmenge, jedoch verlief die Pyruvatbildung sehr unterschiedlich. Wie aus der Abbildung TOLLEs zu entnehmen ist, resultierte z.B. ein Pyruvatgehalt von 4.5 ppm sowohl aus der Vermehrung von Coliformen um das Sechsfache, als auch aus der Vermehrung von Pseudomonaden um das Dreißigfache. Die Vermehrung der Pseudomonaden scheint also anfangs nur mit einem geringen Pyruvatanstieg einherzugehen. Je nach Zusammensetzung der Keimflora und je nach Stärke der Vermehrung der einen oder anderen Keimart können gleiche Keimzahlen zu ganz unterschiedlichen Pyruvatwerten führen. Die Standversuche mit Vorzugsmilchen bei 21°C und 4-5°C bestätigten diesen Zusammenhang: Ein starker Zuwachs der psychrotroph subkultivierbaren Flora führte zu einem nur geringen Pyruvatanstieg in der Milch. Entsprechend blieb bei sehr steilem Pyruvatanstieg pro Keimzunahme der Anteil der psychrotroph subkultivierten Keime nahezu unverändert (s. Tab. 27, S. 6o). Hierin scheint mitbegründet zu liegen, wie es zu der breiten Streuung der Pyruvatwerte beim Vergleich verschiedener Milchproben kam. Die Streuung, die aus den Ergebnissen der 4o Rohmilchproben ermittelt wurde, zeigte eine gewisse Systematik. Die Milchen, bei denen sich ein Pyruvatgehalt ergab, der höher als der Erwartungswert lag, wiesen nur geringe Anteile psychro-

tropher Keime auf (Bereich I der Abb. 15, S. 58). Diese Milchen hatten offenbar einen steilen Pyruvatanstieg hinter sich. Lag der Pyruvatgehalt niedriger als der Erwartungswert, dann war der Psychrotrophen-Anteil recht groß (Bereich III der Abb. 15), also ergab sich offensichtlich ein flacher Pyruvatanstieg bis zum Zeitpunkt der Untersuchung der Milch. Daraus läßt sich eine weitere Gesetzmäßigkeit ableiten: Je stärker die Zunahme des Anteils der Psychrotrophen am Gesamtkeimgehalt ist, desto geringer ist die Pyruvatbildung, die mit der Gesamtkeimvermehrung einhergeht. Hieraus folgt wiederum, daß der Anteil der psychrotroph subkultivierbaren Keime einen Hinweis geben könnte, ob bei einem gegebenen Pyruvatwert ein hoher oder niedriger Gesamtkeimgehalt erwartet werden muß. Dabei stellt sich allerdings die Frage, ob bei Kenntnis des Pyruvatwertes und der Psychrotrophenzahl dem Gesamtkeimgehalt noch irgendeine Bedeutung als Qualitätsparameter beigemessen werden kann.

4.3. Schlußfolgerungen

Die vorliegenden Untersuchungen haben bestätigt:
Im geschlossenen System sind Entwicklung der Gesamtkeimzahl und Pyruvatanstieg in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit eng korreliert.
In einem Kollektiv unterschiedlicher Milchen besteht keine enge Beziehung zwischen Gesamtkeimzahl und Pyruvatwert.
Für die große Streuung sind sowohl die qualitative Zusammensetzung der Flora, als auch die vorangegangenen Lagerbedingungen verantwortlich.
Psychrotrophe verursachen (signifikant) geringere Pyruvatanstiege als die übrigen mesophilen Kontaminanten. Gerade sie sind aber in milchhygienischer Hinsicht suspekt (Proteolyse, Geruchs- und Geschmacksabweichungen, ungünstige Beeinflussung technologischer Eigenschaften, Problemkeime in gesundheitlicher Beziehung).
Pyruvat ist deshalb als alleiniger Parameter für die "bakteriologisch-hygienische Wertigkeit" der Milch nur mit Vorbehalt zu verwerten.

Sofern es gelänge, die durch den Pyruvatwert nicht angemessen repräsentierten milchhygienisch relevanten Floraanteile in ihrer metabolischen Aktivität mittels zusätzlicher Parameter zu erfassen, ließe sich eine exaktere Aussage über die Art der Behandlung im Erzeugerbetrieb und die daraus resultierende mikrobielle Belastung treffen. Die Prüfung dieser Annahme und die Erarbeitung praktikabler Methoden muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Proben der in Berlin (West) angelieferten Milch aus der DDR (Rohmilch) und aus der Bundesrepublik (pasteurisierte Milch), sowie Proben der (West-)Berliner Vorzugsmilch (Rohmilch), wurden auf den Keimgehalt und die Beziehung zwischen Gesamtkeimzahl und Pyruvatgehalt untersucht.

Mehr als 5o % der Rohmilchen aus der DDR hatten Gesamtkeimzahlen über $1o^6$/ml. Die bereits in der Bundesrepublik pasteurisierte Milch enthielt etwa $1o^5$ Keime/ml. Alle Proben der Vorzugsmilch hatten weniger als 2 x $1o^4$ Keime/ml.

Der Anteil der Psychrotrophen stieg schneller als die Gesamtkeimzahl, so daß schließlich eine proteolytische und lipolytische Flora überwog.

Der Pyruvatgehalt stieg mit zunehmender Gesamtkeimzahl an. Jedoch zeigte das Verhältnis Pyruvatgehalt/Gesamtkeimzahl im Vergleich verschiedener Rohmilchproben eine breite Streuung. Standversuche bei 4-5°C jedoch gingen mit einer viel engeren Korrelation zwischen Pyruvat- und Gesamtkeimzahlanstieg einher. Das Verhältnis beider Parameter stieg nach deren logarithmischer Transformation nahezu linear an.

Folgende Abhängigkeiten konnten gezeigt werden:

1. Je geringer der Pyruvatgehalt einer Milch war, um so größer war der folgende Pyruvatanstieg.
2. Bei mittleren Temperaturen (21°C) ergab sich im Vergleich zur Keimvermehrung ein geringerer Pyruvatanstieg in der Milch als bei niedrigen Temperaturen (4-5°C).
3. Je größer das Verhältnis Pyruvat/Gesamtkeimzahl (logarithmisch transformiert) war, desto geringer war der Anteil der Organismen, die bei 4-5°C subkultivierbar waren.

Die Untersuchungen führten zu der Schlußfolgerung, daß eine große Anzahl von Faktoren, wie der Grad der Kontamination, die Zusammensetzung der Keimflora und die Lagerungstemperatur, einen Einfluß auf den Pyruvatanstieg haben. Solange diese Fak-

toren nicht erfaßt werden können, läßt die alleinige Pyruvatbestimmung keine erschöpfende Information über die mikrobielle Belastung der Milch zu. Um zuverlässiger die Sorgfalt bei der Erzeugung und Behandlung der Milch kontrollieren zu können, die sich in der Beziehung zwischen Lagerungsbedingungen, dem Grad der Kontamination, dem Pyruvatgehalt und der Gesamtkeimzahl darstellt, sollten zusätzliche Parameter eingeführt werden. Durch solche zusätzliche Parameter ergänzt, könnte der Pyruvatgehalt eine genauere Information über die bakterielle Belastung der Milch ermöglichen.

SUMMARY

Samples of the milk supply for West Berlin originating from the German Democratic Republic (GDR, raw milk) and from the Federal Republic of Germany (FRG, pasteurized milk) and samples of "Vorzugsmilch" (i.e. raw grade A milk) from West Berlin were investigated on the bacterial count and the interrelations between total bacterial count and pyruvate content in the milk.

More than 50 % of the raw milk deliveries from the GDR had total bacterial counts above 10^6/ml. The counts of the milk samples already pasteurized at the West German dairies averaged at 10^5/ml. All the samples of Vorzugsmilch had counts below 2×10^4/ml.

The portion of psychrotrophs increased more rapidly than did the total bacterial counts and finally resulted in a dominating proteolytic and lipolytic flora.

The pyruvate content increased with the rise of total bacterial counts. However, the pyruvate/total bacterial count ratio evidenced in various raw milk samples a great variation. Storage experiments at 4 to 5°C revealed, however, a closer correlation between increases of pyruvate and total bacterial count. The ratio of these parameters increased approximately linear when either value had been transformed logarithmically.

The following interpendences were shown:

1) The lesser the pyruvate level in a milk, the greater was the pyruvate increase to be expected.
2) At intermediate temperatures (21°C) there was a lower rise of pyruvate in milk compared with the rise of total counts at chilling temperatures (4 to 5°C).
3) The greater the pyruvate/total bacterial count ratio (transformed logarithmically) the smaller was the portion of organisms cultivable at 4 to 5°C.

The investigations reaffirmed the conclusion that a great number of factors such as the degree of contamination, the composition

of the flora, and the storage temperature, have an influence on the rise of the pyruvate level. As long as these factors have not been clearly quantified, the mere determination of the pyruvate level does not provide exhaustive information on the microbiological load of the milk. In order to control more reliably the care of harvesting and handling milk as yet reflected in the interdependence between pyruvate and bacterial counts, storage conditions, and degree of contamination, additional parameters should be established. The pyruvate level could yield more definite information when supplemented by such additional parameters.

6. LITERATUR

ABO-ELNAGA, J.G. und KANDLER, O.: (1965)
Zur Verbreitung der Staphylokokken in Milch
Arch. Lebensmittelhyg. 16. 132

ANTILA, V. und KYLÄ-SIUROLA, A.-L.: (1976)
Die Bestimmung der Milchqualität mit der Lactocult-Methode
Milchwissenschaft 31. 8

BECK, Gg.: (1972)
Psychrotrophe Organismen in Milch
Arch. Lebensmittelhyg. 23. 278

BOCKELMANN, J.: (197o)
Lipolytic and psychrotrophic bacteria in cold-stored milk
XVIII Int. Dairy Congr. 1 E: 1o6

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH BIOCHEMICA (1972)
Biochemica-Test-Combinationen, Grundlagen und Praxis
Test-Fibel-Einlage S. 3

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH BIOCHEMICA (1972)
Biochemica Test Combination Pyruvat
1. Auflage, 872/1

BOUCHEZ, D., WAES, G. und NAUDTS, M.: (1974)
Zur Bestimmung der bakteriologischen Qualität tiefgekühlter Milch
Revue de l'Agriculture 27. 379

BRAATZ, R.: (1975)
Taxonomie der Pseudomonaden aus Milch
Milchwissenschaft 3o. 6o2

BUSSE, M.: (1969)
Die Bedeutung der kältetoleranten Keime für die Milchwissenschaft
Dtsch. Molkerei-Ztg. 9o. 427

CLARK jr., W.S. and NELSON, F.E.: (1961)
Multiplication of coagulase-positive Staphylococci in grade A raw milk samples
J. Dairy Sci. 44. 232

CREDIT, C., HEDEMAN, R., HEYWOOD, P. and WESTHOFF, D.: (1972)
Identification of bacteria isolated from pasteurized milk following refrigerated storage
J. Milk Food Technology 35. 7o8

CRITTALL, G.G. und HAMLYN, A.E.: (1974)
Erfassung der Rohmilchqualität durch eine modifizierte Nitrat-Reduktionsprobe
XIX. Int. Milchw. Kongr. 1 D, 578

CZOK, R. und LAMPRECHT, W. in: H.U. BERGMEYER: (197o)
Methoden der enzymatischen Analyse
2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, S. 14o7

DRUCE, R.G. and THOMAS, S.B.: (197o)	An ecological study of the psychrotrophic bacteria of soil, water, grass and hay J. appl. Bact. 33. 42o
ELLIOT, J.A., EMMONDS, D.R. und YATES, A.R.: (1974)	Zum Einfluß der bakteriologischen Qualität der Milch auf die Eigenschaften der Milchprodukte. Ein Überblick. J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment 7. 32
ENDO, S.: (19o3)	Über ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbacillen Centralbl. Bakt. I. Orig. 35. 1o9
FARMILOE, F.J., CORNFORD, S.J., COPPOCK, J.B.M. and INGRAM, M.: (1954)	The survival of Bacillus subtilis spores in the baking of bread J. Sci. Food Agric. 5. 292
GROSSERHODE: (1974)	Physikalisch-chemische Veränderungen der Milchinhaltsstoffe durch Tiefkühlung der Milch Dtsch. Milchwirtschaft 25. 686
GRÜN, L. und KONSTANTINIDOU, A.: (1971)	Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in kühlgelagerter Rohmilch Milchwissenschaft 26. 413
GYLLENBERG, H.G. and EKLUND, E.: (1966)	A taxonomic survey of the psychrophilic bacteria in milk and milk products Milchwissenschaft 21. 261
HADLAND, G. und HØYE, T.: (1974)	Die bakterielle Aktivität und Lipolyse in roher Sammelmilch während der Lagerung unter Berücksichtigung der Haltbarkeit pasteurisierter Trinkmilch XIX. Int. Milchw. Kongr. 1 D, 4o1
HEESCHEN, W.: (1972)	Biochemische Veränderungen von Lebensmitteln durch psychrotrophe Mikroorganismen Arch. Lebensmittelhyg. 23. 291
HEESCHEN, W., REICHMUTH, J., TOLLE, A. und ZEIDLER, H.: (1969)	Bestimmung der psychrotrophen Keimflora in der Anlieferungsmilch Milchwissenschaft 24. 721
HEESCHEN, W., WERNERY, H., SUHREN, G. und TOLLE, A.: (1974)	Zur automatisierten Messung von Fett, somatischen Zellen und Pyruvat in Milch mit Hilfe der kontinuierlichen Durchflußanalyse Milchwissenschaft 29. 394

HEIDRICH, H.J., GROSSKLAUS, D. und MÜLLING, M.: (1964)
Vergleichende bakterielle Untersuchungen an durch Handmelken und durch Venülenpunktion der Drüsenzisterne gewonnenen Milchen
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 77. 83

INGRAM, M.: (1951)
The effect of cold on micro-organisms in relation to food
Proc. Soc. appl. Bact. 14. 243

INTERNAT. DAIRY FED. (1958)
IDF-Standardmethode
IDF-Standards 3.

KANDLER, O.: (1961)
Die Anwendung der Nitratreduktion zur Qualitätskontrolle der Rohmilch
Dtsch. Molkerei-Ztg. 82. 1283

KANDLER, O.: (1966)
Zur Definition der "psychrophilen" Bakterien
Milchwissenschaft 21. 257

KIURU, K., EKLUND, E., GYLLENBERG, H. und ANTILA, M.: (1971)
Die proteolytische Aktivität der psychrotrophen Mikroorganismen in der Hofbehältermilch
Milchwissenschaft 26. 138

KNAUT, T. und CIESLIK, J.: (1974)
Oxydase-positive Bakterien als Kriterium zur Beurteilung der hygienischen Beschaffenheit der Milch
XIX. Int. Milchw. Kongr. 1 D, 585

KOHLER, J.: (1974)
Erhebungen über den Pyruvat- sowie L(+)- und D(-)-Laktatgehalt in Trockenmilchprodukten
Vet. Diss. München

KOTTERER-MÜNCH: (1972)
Untersuchungsverfahren für das milchwirtschaftliche Laboratorium
Volkswirtschaftl. Verlag GmbH., Kempten, 5. Aufl.

KYLÄ-SIUROLA, A.-L. und ANTILA, V.: (1974)
Zur Bestimmung der Milchqualität durch die Cytochrom-Oxydase-Probe
XIX. Int. Milchw. Kongr. 1 D, 586

LANG, K.: (1967)
Untersuchungen zur Methodik der kulturellen Gesamtkeimzahlbestimmung bei pasteurisierter Milch
Arch. Lebensmittelhyg. 18. 222

LEMBKE, A., KAUFMANN, A. und LAGONI, H.: (1952)
Fermentative Studien an Mikroorganismen
Kieler Milchw. Forsch. Ber. 4. 361

LITT, G.: (1974)
Die lebensmittelhygienische Bedeutung psychrotropher Keime. Vortrag, gehalten anläßlich des XVIII. Internationalen Hygiene-Kolloquiums der Th. Goldschmidt AG am 2o.3.1974 in Essen
Goldschmidt informiert 1. 49

LOTT, G.: (197o)
Die Bedeutung kältetoleranter Keime für die Fleischwirtschaft
Alimenta 9. 17

LOTT, G.: (1972)
Taxonomie und Bedeutung psychrotropher Keime
Arch. Lebensmittelhyg. 23. 265

LÜCK, H., HOLZAPFEL, W.H. und BECKER, P.J.: (1971)
Der Gehalt oxydase-positiver Bakterien in tank-gekühlter Milch und seine Beziehung zur Zahl der psychrotrophen Bakterien
Milchwissenschaft 26. 424

MACKENZIE, E.: (1973)
Thermodure und psychrotrophe Organismen in mangelhaft gereinigten Melkanlagen und in Farmsammeltanks
J. appl. Bact. 36. 457

MOSSEL, D.A.A., MENGERINK, W.H.J. and SCHOLTS, H.H.A.: (1962)
Use of a modified MacConkey agar medium for the selektive growth and enumeration of all Enterobacteriaceae
J. Bact. 84. 381

MOSSEL, D.A.A. and CORNELISSEN, A.M.R.: (1963)
The examination of foods for Enterobacteriaceae using a test of the type generally adopted for the detection of Salmonellae
J. appl. Bact. 26. 444

NAKAE, T.: (197o)
Characterization and classification of psychrotrophic bacteria in milk by means of temperatur-gradient incubation
Milchwissenschaft 25. 161

OLSON, J.C.: (1962)
Hygienic aspects of milk and payment for quality
J. Milk Food Technology 25. 355

POFFÉ, R., WECKX, M. and SIMONART, P.: (1968)
The methylen blue test and the bacteriological quality of milk
Lait 48. 471

PORUBIAKOVA, J. und PREKOPP, I.: (1971)
Studium der psychrophilen Mikroflora in der Schafmilch
Milchwissenschaft 26. 23

RENNER, E. und KIERMEIER, F.: (1961)
pH-Messung bei der Milchannahme
Dtsch. Molkerei-Ztg. 82. 271

RENNER, E. und KIERMEIER, F.: (1968)
Zur Objektivität einiger Untersuchungsmethoden für Anlieferungsmilch
Milchwissenschaft 23. 156

REUTER, G.: (1968)
Erfahrungen mit Nährböden für die selektive mikrobiologische Analyse von Fleischerzeugnissen
Arch. Lebensmittelhyg. 19. 53

REUTER, G.: (1968)
Mikrobiologische Analyse von Lebensmitteln mit selektiven Medien
Arch. Lebensmittelhyg. 19. 3o

SADINI, V.: (1972)
New biochemical index for establishing hygienic quality of milk
Industrie Alimentari 11.

SEELEMANN, M.: (1966)
Zur Frage der Kühlung und Anlieferung der Milch mit besonderem Hinblick auf die zweitägliche Abholung
Milchwissenschaft 21. 748

SINELL, H.-J. und BAUMGART, J.: (1967)
Selektivnährboden mit Eigelb zur Isolierung von pathogenen Staphylokokken aus Lebensmitteln
Zbl. Bakt. I. Orig. 2o4. 248

STAHLHUT-KLIPP, H.: (1975)
Zur Methodik der enzymatischen Pyruvat- und Lactatbestimmung in Rohmilch
Milchwissenschaft 3o. 468

STAHLHUT-KLIPP, H. und KRONENBERGER, E.: (1975)
Die Eignung der Pyruvatbestimmung zur Beurteilung der hygienischen Wertigkeit der Milch
Dtsch. Molkerei-Ztg. 96. 426

STEPHAN, R.: (1969)
Der Keimgehalt der West-Berliner Trinkmilch vor und nach der zweiten Pasteurisierung
Vet. Diss. Berlin (West)

STÜSSI, D.B.: (1974)
Die individuelle Qualitätsbezahlung der Verkehrsmilch im Rahmen der milchwirtschaftlichen Qualitätsförderung
Schweizerische Milchztg. 1oo. 155

SUHREN, G.: (1973)
Zur Eignung der enzymatischen Pyruvatbestimmung für die Messung der bakteriellen Belastung von Milch
Troph. Diss. Bonn

SUHREN, G., HEESCHEN, W. und TOLLE, A.: (1975)
Zur Messung des Verderbnisrisikos von Milch
Milchwissenschaft 3o. 473

SVENSKA MEJERITIDNINGEN: (1973)
Relation between the 12°C methylene blue test and total and psychrotrophic bacterial counts
Dairy Sci. Abstr. 35. 1880

TOLLE, A.: (1969)
Neue Wertmaßstäbe zur Beurteilung biochemischer Veränderungen der Rohmilch
Milchwissenschaft 24. 457

TOLLE, A.: (1973)
Pyruvat als zentrale Schlüsselsubstanz des bakteriellen Katabolismus in Milch
Arch. Lebensmittelhyg. 24. 149

TOLLE, A., HEESCHEN, W., REICHMUTH, J. und KIND, H.: (1971)
Trinkmilch in der Bundesrepublik Deutschland: Ihr bakteriologischer, biochemischer und rückstandsanalytischer Status
Milchwissenschaft 26. 401

TOLLE, A., HEESCHEN, W., REICHMUTH, J. und WERNERY, H.: (1972)
Möglichkeiten zur Automatisierung der Keimzählung
Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. A 220. 162

TOLLE, A., HEESCHEN, W., REICHMUTH, J., WERNERY, H. und SUHREN, G.: (1972)
Die Pyruvatbestimmung - ein neuer Weg zur Messung der bakteriologischen Wertigkeit von Milch
Milchwissenschaft 27. 343

TOLLE, A., ZEIDLER, H. und HEESCHEN, W.: (1966)
Zur Beurteilung der hygienischen Qualität der Anlieferungsmilch mit Hilfe neuer Methoden
Milchwissenschaft 21. 757

TOLLE, A., ZEIDLER, H. und HEESCHEN, W.: (1968)
Die elektronische Mikrokoloniezählung - ein Verfahren zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Qualität der Rohmilch
Milchwissenschaft 23. 65

WASSERFALL, F.: (1975)
Über die Abhängigkeit von Variablen. Kritische Bemerkungen zur Anwendung der Regression und des Korrelationskoeffizienten bei der Bewertung von Analysenergebnissen
Milchwissenschaft 30. 290

WERNERY, H.: (1972)
Zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit von Milch durch die quantitative Bestimmung von Pyruvat und die Computer-Bild-Analyse von Plattenkulturen
Vet. Diss. Berlin (West)

WERNERY, H., SUHREN, G., HEESCHEN, W., TOLLE, A. und REICHMUTH, J.: (1974)
Untersuchungen zur bakteriellen Belastung der Milch zwischen Gewinnung und Konsum in 9 Versorgungsgebieten der BRD
Dtsch. Molkerei-Ztg. 95. 1222

WIESNER, H.-U.: (1975)
Zur Aussagekraft des Pyruvatgehaltes in Rohmilch beim Erzeuger
Milchwissenschaft 30. 471

Lebenslauf

Am 26. Februar 1947 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Rolf Röschke und seiner Ehefrau Gisela, geb. Weiss, in Göggingen bei Augsburg geboren. Eingeschult wurde ich 1953 in die Heinrich-Heine-Schule in Erkner bei Berlin, ich beendete die Grundschule 1959 in Berlin-Grunewald und besuchte anschließend bis zum Abitur im Jahre 1966 die Walther-Rathenau-Schule. An der Freien Universität Berlin studierte ich von 1967 bis 1973 Veterinärmedizin. Das Physikum legte ich 1970 ab, das Staatsexamen beendete ich im Juni 1973. Am 1o. August 1973 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt. Nach einigen Monaten der Tätigkeit in einer Kleintierpraxis in Berlin arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation. Seit Herbst 1976 bin ich in einer Großtierpraxis in Schleswig-Holstein beschäftigt.